

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Nanomecánica de proteínas neurotóxicas:
características moleculares comunes en el inicio de la
cascada de neurodegeneración

Tesis doctoral
Rubén Hervás Millán

Madrid, enero 2013

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Nanomecánica de proteínas neurotóxicas: características moleculares comunes en el inicio de la cascada de neurodegeneración

Memoria presentada por **Rubén Hervás Millán**
para optar al grado de Doctor en Biología Molecular.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido desarrollado en el
Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo del
Instituto Cajal (IC-CSIC), bajo la dirección del
Dr. Mariano-Sixto Carrión Vázquez.

Madrid, enero 2013



Memoria presentada por **RUBÉN HERVÁS MILLÁN**, licenciado en Bioquímica, para optar al grado de DOCTOR EN BIOLOGÍA MOLECULAR POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

MARIANO-SIXTO CARRIÓN VÁZQUEZ, Doctor en Biología y Científico Titular del CSIC,

AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Nanomecánica de proteínas neurotóxicas: características moleculares comunes en el inicio de la cascada de neurodegeneración**”, de la que es autor el Lcdo. Rubén Hervás Millán y ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto Cajal del CSIC, Madrid.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid, el día 10 de enero de 2013.

Fdo.: Mariano-Sixto Carrión Vázquez

Instituto Cajal, CSIC
Madrid

Resumen del trabajo

El desarrollo reciente de las técnicas monomoleculares ha proporcionado una herramienta versátil para la manipulación de moléculas individuales de proteína, lo que ha permitido abordar cuestiones biológicas importantes en áreas clave de la biología celular (como la adhesión y la señalización celulares o la neurodegeneración) y de la ciencia de proteínas (como el plegamiento, la estructura y estabilidad de proteínas, la catálisis, el estudio evolutivo de las proteínas o el polimorfismo conformacional y su relación con la amiloidogénesis/neurodegeneración). Una de estas técnicas, la espectroscopía de fuerzas de molécula individual basada en la microscopía de fuerzas atómicas (de sus siglas inglesas, AFM-SMFS), en combinación con ingeniería de proteínas y aproximaciones teórico/computacionales, ha permitido un avance sin precedentes en la caracterización y comprensión a nivel molecular de las propiedades mecánicas de biomoléculas en general y de proteínas en particular. De esta forma ha emergido un campo nuevo de investigación, emocionante y de rápido crecimiento denominado “nanomecánica de proteínas”. Este campo trata de estudiar la respuesta de las proteínas a la aplicación de una fuerza externa (un agente fisiológico desnaturalizante en la célula para diversas proteínas), que genera un estiramiento (típicamente axial) de la molécula bajo estudio. La capacidad de una proteína para resistir fuerza está relacionada con su estabilidad mecánica y esto, a su vez, se encuentra estrechamente relacionado con su conformación. Las proteínas desempeñan un papel fundamental en la célula en muchos procesos guiados mecánicamente y, por esta razón, cualquier interrupción o alteración de su comportamiento mecánico podría afectar a la función celular normal. Como resultado, podrían producirse anomalías en mecano-respuestas celulares que desembocasen en diversas enfermedades de claro origen mecánico como pérdida de audición, trastornos cardiovasculares, distrofia muscular, osteoporosis, o cáncer, y otras de posible origen mecánico como las enfermedades conformacionales, tales como los trastornos neurodegenerativos. Las enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas son trastornos incurables de alto impacto social en los que se encuentran implicadas proteínas específicas que generalmente no presentan un plegamiento tridimensional definido. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente a estas enfermedades sigue siendo una incógnita que se ha resistido a las aproximaciones tradicionales establecidas. Aunque su causa primaria es desconocida, una de las hipótesis más aceptadas postula que un cambio conformacional crítico en estas “proteínas neurotóxicas” desencadena la cascada patogénica, a través de un mecanismo común para todas ellas en el que está implicada la formación de una estructura rica en estructura β , que finalmente resulta en una “ganancia de función tóxica”. En esta tesis, se aborda el análisis nanomecánico mediante AFM-SMFS de varias proteínas relacionadas causalmente con las enfermedades neurodegenerativas humanas más representativas. Este análisis se apoya en técnicas estructurales, de imagen e ingeniería de proteínas para en conjunto llevar a cabo la identificación y análisis inequívoco de moléculas individuales mediante SMFS. Los resultados destacan la importancia de las propiedades mecánicas de las proteínas implicadas en estas enfermedades y revelan un rico polimorfismo conformacional en el monómero de todas las proteínas neurotóxicas representativas estudiadas que comprende desde abundantes conformeros con estabilidad mecánica muy baja a eventos hiper-mecanoestables poco frecuentes. Además, dicho polimorfismo conformacional correlaciona muy bien con el proceso de amiloidogénesis y neurotoxicidad: desaparece en un mutante incapaz de oligomerizar/fibrillar, resulta favorecido por formas familiares de enfermedades neurodegenerativas, y es reducido por un inhibidor (sorprendentemente promiscuo) del cambio conformacional crítico en el monómero, neurotoxicidad y neurodegeneración. El polimorfismo conformacional, junto con la capacidad que posee este putativo agente farmacológico para disminuir la heterogeneidad conformacional, revela características moleculares comunes a nivel de monómero para diversas proteínas neurotóxicas. Se postula que conformeros

mecanoestables específicos podrían constituir especies moleculares primarias comunes que podrían estar vinculadas con el desarrollo de estas enfermedades, lo que sugiere una vía común para diagnosticar, prevenir, detener o revertir diferentes trastornos neurodegenerativos con un mismo agente farmacológico.

Summary

The recent development of single molecule techniques has provided a versatile tool for imaging and manipulating protein molecules one at a time, enabling us to address important biological questions in key areas of protein science (*e.g.*, protein folding, protein structure and stability, catalysis, protein evolution, conformational polymorphism and amyloidogenesis) and cell biology (*e.g.*, cell adhesion and signalling, neurodegeneration). One of these techniques, single-molecule force spectroscopy based on atomic force microscopy (AFM-SMFS), combined with theoretical and computational approaches and protein engineering, has allowed unprecedented progress in characterizing and understanding at the molecular level the mechanical properties of biomolecules and, in particular, those of proteins. This is one of the main pillars of the new, exciting and fast-growing research field of “*protein nanomechanics*”, which aims to study the response of proteins to the application of an external force (a physiological denaturing agent for proteins in the cell), which generates a typically axial stretching of the molecule under study. The ability of a protein to withstand force is related to its mechanical stability, which is strictly linked to its structural conformation. Proteins play a pivotal role in many mechanically guided processes so that any deregulation that interrupts or alters their mechanical properties could jeopardize the normal cellular function. This could potentially bring about diverse diseases that have a mechanical origin or present abnormalities in cellular mechanoresponses such as loss of hearing, cardiovascular disorders, muscular dystrophy, osteoporosis and cancer. Furthermore, the mechanical stability of certain proteins has been recently related with conformational diseases such as neurodegenerative disorders. Amyloidogenic neurodegenerative diseases are incurable conditions with high social impact that are caused by specific, usually largely disordered proteins. However, the underlying molecular mechanism remains elusive to established techniques. Although their primary cause is unknown, a favoured hypothesis postulates that a critical conformational change in the monomer of these “neurotoxic proteins” results in a toxic gain-of-function that triggers the pathogenic cascade through a rather common mechanism that involves the formation of β -sheet structure. In this thesis, I present a nanomechanical analysis by AFM-SMFS of several proteins related to the most representative human neurodegenerative diseases. This analysis is not only supported with established bulk structural and imaging techniques, but also protein engineering so as to be able to unequivocally measure single-molecule events. Our results reveal the importance of the mechanical properties of the proteins related to neurodegenerative diseases by displaying a rich conformational polymorphism in the monomer ranging from abundant hipo-mechanostability to rare hyper-mechanostability events. Furthermore, this polymorphism strongly correlates with amyloidogenesis and neurotoxicity: it is absent in a fibrillization-incompetent mutant, favoured by familial-disease mutations and diminished by a surprisingly promiscuous inhibitor of the critical monomeric β -conformational change, neurotoxicity and neurodegeneration. Our results highlight the importance of single-molecule techniques to study neurodegeneration. The presence of conformational heterogeneity in all these proteins as well as the demonstrated ability to inhibit it in most cases by a single pharmacological agent reveals common features at the level of the monomer. We postulate that specific mechanostable conformers may constitute common primary molecular species that could be related to the development of these diseases, which suggests a common pathway to diagnose, prevent, halt or reverse different neurodegenerative diseases by a single pharmacological agent.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 12 |
| 1.1. El plegamiento proteico. Un problema interdisciplinar. | 12 |
| 1.1.1. Fundamentos generales del plegamiento de proteínas | 12 |
| 1.1.1.1. El postulado de Anfinsen y la paradoja de Levinthal | 12 |
| 1.1.1.2. Existencia de intermediarios en la ruta de plegamiento | 14 |
| 1.1.1.3. Modelos clásicos de plegamiento proteico | 14 |
| 1.1.1.4. Conceptos emergentes: el pailsaje, el embudo de plegamiento y plegamiento sin barreras | 15 |
| 1.2. Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs) | 17 |
| 1.2.1. Un nuevo paradigma proteico: la “trinidad proteica” | 18 |
| 1.2.2. IDPs y proteoma. ¿Por qué existen las IDPs? | 18 |
| 1.2.3. Relación entre IDPs y amiloidosis /neurodegeneración | 19 |
| 1.2.4. QBP1: un péptido inhibidor de la amiloidogénesis | 22 |
| 1.2.5. Análisis de IDPs: técnicas monomoleculares vs. poblacionales | 23 |
| 1.3. Mecánica monomolecular de proteínas | 25 |
| 1.3.1. Fuerza, un parámetro clave en Biología. Proteínas con función mecánica | 25 |
| 1.3.2. Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM). Invención y usos | 26 |
| 1.3.2.1. Modo de espectroscopía de fuerzas de moléculas individuales (SMFS) | 27 |
| 1.3.2.1.1. Principio físico | 28 |
| 1.3.2.1.2. Modalidades de espectroscopía de fuerzas | 29 |
| 1.3.2.2. Nanomecánica de proteínas: determinantes de estabilidad mecánica y uso de poliproteínas | 32 |
| 2. Objetivos | 34 |
| 3. Materiales y métodos | 36 |
| <i>Clonaje molecular</i> | 37 |
| <i>Expresión y purificación de las proteínas analizadas</i> | 41 |
| <i>AFM-SMFS: sustratos usados, preparación de experimentos y análisis de datos</i> | 42 |
| <i>iAFM</i> | 45 |
| <i>Análisis mediante CD</i> | 45 |
| <i>Análisis mediante DSC</i> | 46 |
| <i>Análisis mediante NMR</i> | 46 |
| <i>TEM</i> | 47 |
| <i>Turbidimetría y ensayos de unión de Rojo Congo</i> | 48 |
| <i>Predicción computacional de orden/desorden en las proteínas estudiadas</i> | 48 |

| | |
|--|------------|
| 4. Resultados | 49 |
| <i>SMFS estándar (estrategi “flanqueante”) y controles de agregación/amiloidogénesis</i> | 50 |
| <i>Análisis inequívoco de SMFS (estrategia “portador-huésped”) y controles de preservación de estructura y de agregación/amiloidogénesis</i> | 53 |
| <i>Polimorfismo conformacional de NPs</i> | 71 |
| <i>La inhibición de oligomerización no altera el polimorfismo conformacional</i> | 82 |
| <i>Un mutante anti-amiloidogénico suprime el polimorfismo conformacional</i> | 83 |
| <i>Formas familiares de enfermedades neurodegenerativas incrementan el polimorfismo conformacional</i> | 83 |
| <i>Un inhibidor promiscuo de la transición estructural disminuye el polimorfismo conformacional</i> | 84 |
| 5. Discusión | 85 |
| 6. Conclusiones | 97 |
| 7. Bibliografía | 100 |
| 8. Anexos | 109 |
| 8.1. Material Suplementario | 110 |
| 8.1.1. Introducción a las técnicas empleadas | 110 |
| 8.1.1.1. Modo de imagen por AFM | 110 |
| 8.1.1.1.1. Principio físico | 110 |
| 8.1.1.1.2. Modalidades de adquisición de imagen | 114 |
| 8.1.1.2. SMFS: parámetros relevantes | 116 |
| 8.1.1.3. SMFS: logros y limitaciones | 118 |
| 8.1.1.4. Dicroísmo Circular | 122 |
| 8.1.1.5. Resonancia Magnética Nuclear | 123 |
| 8.1.1.6. Calorimetría Diferencial de Barrido | 125 |
| 8.1.1.7. Microscopía Electrónica de Transmisión | 126 |
| 8.1.2. Protocolos experimentales: SMFS y análisis de datos | 128 |
| 8.1.3. Reactivos | 134 |
| 8.1.4. Glosario de anglicismos y expresiones abreviadas | 146 |
| 8.1.5. Índice de figuras y tablas | 147 |
| 8.2. Publicaciones y patentes derivadas | 149 |

Clave de abreviaturas y siglas

- α -syn: alfa-sinucleína (*alpha-synuclein*).
- ΔL_c : incremento de longitud de contorno (*Contour Length Increase*).
- A β 42: péptido beta amiloide 1-42 (*Amyloid Beta 1-42*).
- AFM: microscopio de fuerza atómica o microscopía de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscope/Microscopy*).
- Antp: Antennapedia (péptido “penetratina”).
- Arc: mutación arctic (E22G).
- ATP: adenosin-trifosfato (*Adenosin Tri-Phosphate*).
- BFP: sonda de fuerza basada en una biomembrana (*Biomembrane Force Probe*).
- CD: dicroísmo circular (*Circular Dichroism*).
- cDNA: DNA complementario: secuencia de DNA codificante obtenido a partir de RNA (*complementary DNA*).
- Da: Dalton.
- DNA: ácido desoxi-ribonucleico (*DesoxiriboNucleic Acid*).
- DSC: calorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry*).
- DSS: sodio 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato (2,2-Dimethyl-2-Silapentane-5-Sulfonate sodium salt).
- EC₅₀: concentración efectiva máxima media (*Half Maximal Effective Concentration*).
- E. coli*: *Escherichia coli*.
- EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético (*EthyleneDiamine Tetraacetic Acid*).
- F_u : fuerza de desplegamiento (*unfolding Force*).
- FID: decaimiento de señal de NMR (*Free Induction Decay*).
- FRET: fluorescencia por transmisión de energía de resonancia (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).
- FT: transformada de Fourier (*Fourier Transform*).
- GdmCl: cloruro de guanidinio (Guanidinium hydroChloride).
- hM: hiper mecanoestable (*hyper-Mechanostable*).
- I27: módulo tipo inmunoglobulina de titina cardiaca humana, siguiendo la nomenclatura de Labeit y Kolmerer (posteriormente renombrado como I91 por Bang y cols.)
- iAFM: AFM en el modo de imagen.
- IDP: proteína intrínsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Protein*). Sinónimo de NUP.
- IPTG: isopropyl β -D-1-tiogalactopiranosido (*Isopropyl β -D-1 ThioGalactopyranoside*).
- M: mecanoestable (*Mechanostable*).
- MCS: sitio de clonaje múltiple (*MultiCloning Site*).
- MMI: técnicas de Manipulación de Moléculas Individuales.
- MOPS: ácido sulfónico de 4-morfolinopropano (*4-MOrpholinePropaneSulfonic acid*).
- mQ: agua destilada purificada mediante un intercambio iónico (cartucho) y ultrafiltración (filtro de membrana). La pureza del agua se mide mediante su conductividad, el inverso de la resistividad, que debe ser mayor de 18.2 M Ω /cm (a 25 °C).
- ND: no determinado (*Non Determined*).
- Ni²⁺: níquel (2+).
- NM: no mecanoestable (*Non Mechanostable*).
- NMR: resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*).
- NOE: efecto nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser Effect*).
- NOESY: espectroscopía de resolución de NOEs (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*).
- NP: proteína neurotóxica (*Neurotoxic Protein*).
- NTA: ácido nitrilo triacético (*Nitrilo Triacetic Acid*).
- NUP: proteína nativamente desordenada (*Natively Unfolded Protein*). Sinónimo de IDP.

OD: densidad óptica (*Optical Density*).

o/n: durante la noche (*over night*).

PAGE: electroforesis en gel de poli-acrilamida (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Si se realiza en condiciones desnaturalizantes mediante la adición de SDS, se denomina SDS-PAGE.

PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PDB: banco de datos de estructuras de proteínas (*Protein Data Bank*).

pFS: plásmido para espectroscopía de fuerza (*plasmid for Force Spectroscopy*).

polyQ: poliglutamina (*polyglutamine*).

QBP1: péptido de unión a poliglutamina-1 (*poly-Q Binding Peptide 1*).

RC: ovillo estadístico (*Random Coil*).

RT: temperatura ambiente (*Room Temperature*).

RNA: ácido ribonucleico (*RiboNucleic Acid*).

SCA: ataxia espinocerebelosa (*SpinoCerebellar Ataxia*).

SCR: péptido con la misma composición de aminoácidos que QBP1 pero diferente secuencia (*SCRambled*).

SD: desviación estándar (*Standard Deviation*).

SDS: dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*).

SDS-PAGE: ver PAGE.

SEM: error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*).

SMFS: espectroscopía de fuerzas de molécula individual (*Single Molecule Force Spectroscopy*).

Sup35NM: región Media y N-terminal de la proteína priónica Sup35 de *Saccharomyces cerevisiae*.

TEM: microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*).

thio: tiorredoxina (*THIOredoxin*).

TIRF: fluorescencia debida al fenómeno de reflexión interna total (*Total Internal Reflection Fluorescence*).

TS: estado de transición (*Transition State*).

ubi: ubiquitina.

UV: UltraVioleta.

VMD: programa de visualización de dinámica molecular (*Visual Molecular Dynamics*).

WLC: cadena gusaniforme (*Worm-Like Chain*).

wt: tipo silvestre (*wild type*).

1. Introducción

1. Introducción

Linus Pauling estableció la existencia de un estado, termodinámicamente estable, con estructura helicoidal para ciertos tipos de proteínas en base a predicciones teóricas basadas en la extensión de argumentos de minimización energética de sistemas cristalinos al caso de macromoléculas biológicas (Pauling *et al.* 1951), lo que representó la primera conexión entre los campos de la biología molecular y la física. La confirmación experimental de este hecho, observada primero por James Watson y Francis Crick para la molécula del DNA (Watson y Crick 1953) y posteriormente por John Kendrew para la molécula de mioglobina (Kendrew 1958), establece por primera vez la **relación** existente entre **estructura y función**. Un ejemplo bien conocido de esta relación es el problema del **plegamiento proteico**, que se refiere a la elucidación de los mecanismos a través de los cuales una proteína adquiere una conformación tridimensional única y termodinámicamente estable, imprescindible para que pueda ejercer su(s) función(es) biológica(s).

1.1. El plegamiento proteico. Un problema interdisciplinar

El plegamiento proteico, considerado como una segunda “traducción” del mensaje genético, completa la información transferida del DNA al producto final, la proteína activa. En otras palabras, para entender completamente el denominado **dogma central de la biología molecular**, es necesario descifrar el código del plegamiento, la segunda parte del mensaje genético:

*DNA → RNA → cadena polipeptídica → **proceso de plegamiento (¿?)** → proteína activa.*

Las cuestiones fundamentales parecen ser las siguientes: ¿cómo codifica la secuencia el plegamiento dado que el esqueleto (sucesión de enlaces peptídicos más los enlaces del C_α con N y el grupo carbonilo) de todas las proteínas tiene la misma composición? En otras palabras, ¿cómo dictan las cadenas laterales de los aminoácidos el plegamiento? ¿Cómo encuentra una determinada secuencia su estructura nativa ante el enorme número de conformaciones posibles que puede adoptar el polipéptido? ¿Cómo se inicia el proceso de plegamiento y cuál es (son) la(s) vía(s) de plegamiento? Y finalmente, ¿las reglas que podamos deducir de los estudios de plegamiento *in vitro* son válidas para los procesos de plegamiento *in vivo*?

El plegamiento proteico es un campo de investigación extremadamente activo que involucra los campos de la biología, la química, la bioquímica, la bioinformática y la física. Los principios fundamentales tienen aplicaciones prácticas en los recientes avances de la investigación sobre genomas, en la comprensión de diversas patologías y en el diseño de proteínas *de novo* con funciones especiales.

1.1.1. Fundamentos generales del plegamiento de proteínas

1.1.1.1. El postulado de Anfinsen y la paradoja de Levinthal

El importante logro de Christian Anfinsen y su grupo al replegar la ribonucleasa A, reducida y desnaturalizada, recobrando el enzima plenamente activo marcó el inicio de la era moderna en el estudio del plegamiento proteico. A partir de sus resultados, el autor concluía que “la estructura tridimensional de una proteína en su medio fisiológico normal (disolvente, pH,

fuerza iónica, presencia de otros componentes como iones metálicos o grupos prostéticos, temperatura y otros factores) es aquella en la cual la energía libre de Gibbs del sistema completo es menor; esto es, la conformación nativa está determinada por la totalidad de las interacciones interatómicas y, por tanto, por la secuencia de aminoácidos, en un medio determinado” (Anfinsen 1973). A partir del **postulado de Anfinsen** surgió el corolario del control termodinámico en el plegamiento proteico. Este proceso fue discutido por Levinthal, en base al relativamente corto periodo de tiempo que requiere el proceso de plegamiento. Según él, no se podría dar una búsqueda al azar (representada por la **hipótesis del control termodinámico** de Anfinsen, **Fig. 1-1**) de todas las conformaciones proteicas posibles, dado el enorme periodo de tiempo que requeriría.

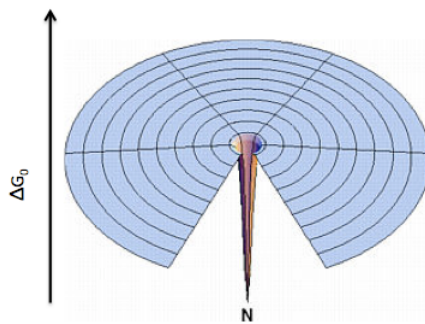


Figura 1-1. Paisaje energético para el plegamiento proteico según la hipótesis del control termodinámico. Según esta hipótesis, cada residuo se pliega independientemente el uno del otro, lo que haría que el tiempo total de plegamiento de una proteína fuera incluso mayor que la edad de nuestro universo. Esta imagen muestra lo difícil que sería encontrar el camino correcto de plegamiento entre los millones de conformaciones incorrectas sin ningún tipo de cooperatividad. La cooperatividad en proteínas supera este problema, ya que cada paso correcto en el plegamiento coordina los pasos siguientes. Figura obtenida de la página web del Profesor Ken Dill de la Universidad de California.

Así pues, si se toma como ejemplo una cadena polipeptídica de 101 residuos de aminoácidos, y si se asumen tan sólo tres posibles conformaciones por residuo, existen 3^{100} ($5 \cdot 10^{47}$) posibles conformaciones para la cadena completa. Si se asume que el tiempo mínimo que necesita una conformación para transformarse en otra es de 10^{-13} segundos, el tiempo necesario para la búsqueda de la estructura de menor energía sería $1,6 \cdot 10^{27}$ años. Una cifra completamente irreal en un contexto biológico donde el tiempo de plegamiento para una proteína globular típica es del orden de milisegundos (o incluso a veces menor), segundos o, como mucho, minutos. Es evidente que la evolución biológica ha hallado una solución efectiva a este problema combinatorial. La enorme discrepancia entre el tiempo calculado y el tiempo de plegamiento real se conoce como “**paradoja de Levinthal**” (Levinthal 1968). De ahí que el autor sugiera que las proteínas no realizan una búsqueda al azar, sino que siguen una **ruta concreta de plegamiento** (en contraposición al control termodinámico, por Anfinsen, **Fig. 1-2**).

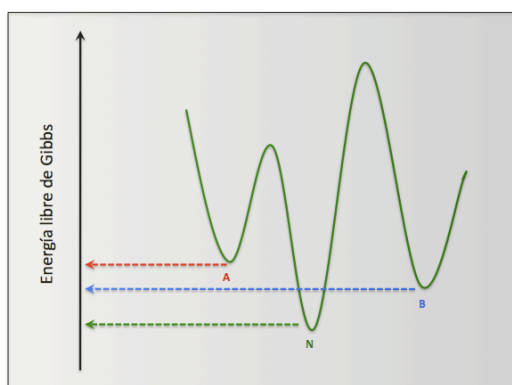


Figura 1-2. Controversia entre la hipótesis termodinámica vs. cinética. Se muestran tres estados energéticos donde N es la forma nativa, que representa el mínimo global de energía, y A y B son formas parcialmente plegadas (intermediarios) que representan mínimos locales de la energía libre de Gibbs. El estado B se halla más cercano a N energéticamente (termodinámicamente, por tanto), mientras que el estado A se halla más cercano cinéticamente a N (la barrera energética a superar es menor), de ahí el origen de la controversia.

1.1.1.2 Existencia de intermediarios en la ruta de plegamiento

Durante mucho tiempo se consideró que la transición entre proteína plegada y desplegada bajo condiciones fisiológicas era un **proceso de dos estados** en el que tan sólo se hallarían representados de manera significativa la especie nativa y la especie desnaturalizada. Sin embargo, gracias a los estudios cinéticos que se realizaron con el objeto de explicar la paradoja de Levinthal se demostró la existencia de **intermediarios de plegamiento**, que corresponderían a mínimos locales de la **energía libre de Gibbs**, de ahí su relativa estabilidad.

Una observación más detallada mostró que no todos los intermediarios poseían la misma estabilidad y que, además, no todos conducían a la proteína nativa. Por ello, los intermediarios de plegamiento se separaron en dos tipos (Baldwin 1996):

1. **Intermediarios *off-pathway*** (fuera de la ruta de plegamiento).
2. **Intermediarios *on-pathway*** (dentro de la ruta de plegamiento).

Si bien los intermediarios *off-pathway* no nos aportan información sobre la ruta de plegamiento, proporcionan una explicación coherente acerca de fenómenos de **mal plegamiento** (*misfolding*) (Krishna *et al.* 2004): constituyen **trampas cinéticas** donde la proteína puede permanecer y, en casos extremos, agregar y desencadenar procesos patológicos, como se mostrará más adelante.

1.1.1.3. Modelos clásicos de plegamiento proteico

Para explicar la paradoja de Levinthal se han propuesto diferentes modelos de plegamiento basados tanto en observaciones experimentales (Kim y Baldwin 1990) como en consideraciones teóricas (Karplus y Sali 1995). Aquí citamos los más representativos:

1. **Modelo de nucleación-propagación.** En este modelo se forman uno o más núcleos estructurales, alrededor de los cuales crece (“se propaga”) la estructura. Alan Fersht refinó dicho modelo añadiendo la idea de la formación de un núcleo inicial débil que es estabilizado por interacciones de largo alcance (Fersht 1997).
2. **Modelo de armazón (*framework*).** Tras el primer suceso (nucleación), se forman las estructuras secundarias que a su vez se asociarán para formar estructuras suprasecundarias, y a partir de aquí los dominios y eventualmente el monómero activo.
3. **Modelo de difusión-colisión.** Desarrollado en 1976 por Martin Karplus y David Weaver quienes lo actualizaron en 1994 a la luz de datos experimentales más recientes (Karplus y Weaver 1994). En este modelo, la nucleación sucede simultáneamente en partes diferentes de la cadena polipeptídica generando microestructuras.
4. **Modelo del colapso hidrofóbico.** Postula que el primer evento consiste en un colapso a través de interacciones hidrofóbicas de largo alcance (Dill 1985). La idea se originó a partir del trabajo de Walter Kauzmann, donde el **efecto hidrofóbico** es considerado como la fuerza líder en el plegamiento y la estabilización proteica (Kauzmann 1959). Una de las aportaciones más interesantes de este modelo fue el concepto de **glóbulo fundido** (*molten globule*, **Fig. 1-3**), un intermediario temprano que aparece en los primeros estadios del plegamiento proteico y que se caracteriza por tener un elevado grado de estructura secundaria. Tras su formación se llevaría a cabo una reordenación de un número pequeño de estados condensados.

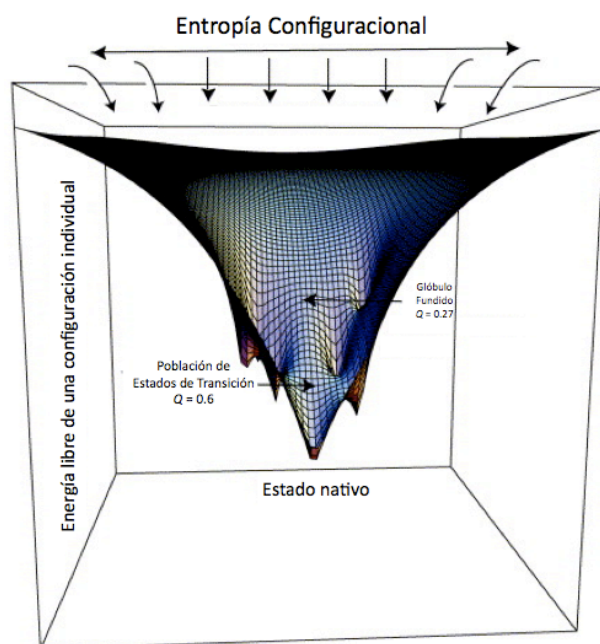


Figura 1-3. Representación esquemática bidimensional de la energía en la ruta de plegamiento. La anchura del embudo representa la entropía conformacional mientras que su profundidad representa la energía libre. Q es otra coordenada de reacción usada para describir el proceso de plegamiento que representa la fracción de contactos nativos para cada estado energético. Figura adaptada de Onuchic *et al.* 1996.

Recientemente, otro intermediario que precede al glóbulo fundido ha sido identificado por Oleg Ptitsyn (Ptitsyn 1995) y Vladimir Uversky (Uversky y Ptitsyn 1996). Esta especie, menos compacta que un glóbulo fundido, presenta un contenido menor de estructura secundaria, y muestra regiones hidrofóbicas accesibles al solvente. Mei-Fen Jeng y Walter Englander lo llamaron **pre-glóbulo fundido** (*pre-molten globule*, (Jeng y Englander 1991)).

Si se consideran genéricamente los modelos clásicos se concluye que los primeros sucesos del plegamiento proteico consisten en un colapso hidrofóbico acompañado (o no) de la formación de estructuras secundarias. Los sucesos intermedios en escala de tiempo (como aparición de sitios de unión a sustratos/ligandos) suceden después de la formación del glóbulo fundido y antes de la etapa limitante del proceso de plegamiento que genera la estructura nativa/funcional. En los pasos finales, la proteína adquiere su **conformación nativa** con la emergencia de sus propiedades funcionales. Estos sucesos finales corresponden a la ordenación precisa de los elementos de estructura secundaria, el correcto empaquetamiento del núcleo hidrofóbico, la correcta disposición y ensamblaje de dominios en proteínas multidominio, el reordenamiento de puentes disulfuro o la isomerización *cis-trans* de la prolina.

1.1.1.4. Conceptos emergentes: el paisaje, el embudo de plegamiento y plegamiento sin barreras

A lo largo de los años se han propuesto pues numerosos modelos fenomenológicos para explicar el plegamiento proteico. Recientemente se ha propuesto un modelo unificado de plegamiento proteico denominado **nueva visión** (*new view*). Dicho modelo, ilustrado por el concepto "**embudo de plegamiento**" presentado por Peter Wolynes y colaboradores (Bryngelson *et al.* 1995), se presenta en términos de energía de plegamiento y describe el comportamiento termodinámico y cinético de la transformación de un conjunto de moléculas desplegadas a un estado predominantemente nativo (**Fig. 1-4**). Los autores sugieren la existencia de rutas de plegamiento paralelas, donde la tasa de plegamiento se ve ralentizada

por huecos que corresponden a mínimos energéticos locales donde se encuentran intermediarios estables. La metáfora del “**paisaje energético**” provee un marco conceptual para entender las dos cinéticas de plegamiento, **dos estados** (Fig. 1-4a) y **multiestado** (Fig. 1-4b), así como el mal plegamiento y agregación proteica (Dill y Chan 1997). Diversos resultados experimentales apoyan esta teoría y demuestran que la cadena polipeptídica, inicialmente extendida, se pliega a través de una población heterogénea de intermediarios parcialmente plegados en un equilibrio fluctuante (Dinner *et al.* 2000).

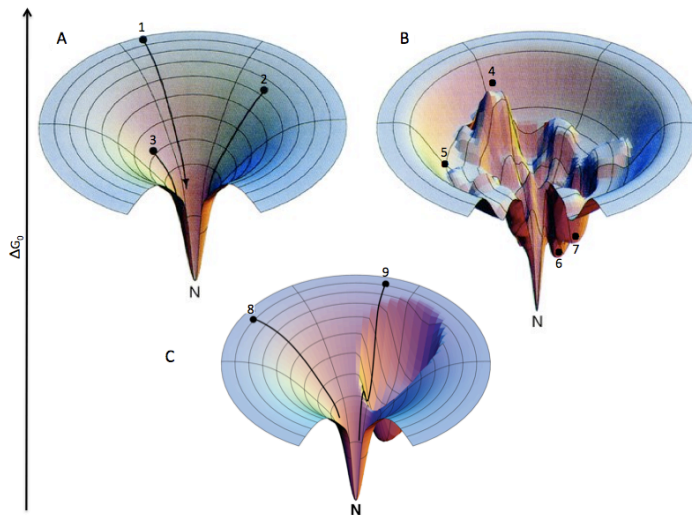


Figura 1-4. Embudos representando un paisaje energético de plegamiento ideal (a) o un paisaje energético de plegamiento rugoso (b), con trampas cinéticas (c). a) Ejemplo característico para proteínas con cinéticas de plegamiento ultra-rápido. La cadena polipeptídica desplegada se encuentra en la parte superior del embudo que representa el paisaje energético y, a medida que van apareciendo interacciones intra-cadena, va

disminuyendo la energía libre (descendiendo en el embudo) y reduciéndose progresivamente el número de conformaciones posibles (entropía conformacional). Finalmente, se consigue un único estado nativo en el mínimo energético (N, del inglés native state). Nótese que el número de rutas de plegamiento disponibles desde el estado desplegado no es ilimitado, tal y como se representa aquí, pero sí puede ser múltiple (1-3). **b)** Descendiendo a través de un paisaje energético rugoso, el polipéptido puede caer en una trampa cinética (las proteínas pueden permanecer en un **estado meta-estable** durante un periodo de tiempo más o menos prolongado llegando incluso a agregar, por encontrarse en un mínimo energético local) o, alternatively, puede descender hasta el estado nativo a través de una estrecha ruta. 4 representa una conformación inaccesible. 5; glóbulo fundido. 6 y 7; proteínas erróneamente plegadas. *In vivo*, chaperonas moleculares pueden actuar suavizando superficies rugosas, previniendo (o rescatando) al polipéptido de caer en una trampa cinética. **c)** Ejemplo de ruta de plegamiento con una trampa cinética; 9. Figura modificada de Dill y Chan 1997.

Recientes desarrollos experimentales están cambiando la manera en que se interpretan los datos, estableciendo una conexión más cercana con la teoría y una mejor comprensión global del problema del plegamiento. De esta forma, un nuevo tipo de mecanismo, el **plegamiento de un estado o sin barreras** (*downhill*) ha sido identificado en varias proteínas de plegamiento ultra-rápido (en el rango de μs). Está caracterizado por no presentar barreras de energía libre significantes ($\leq 3RT$, RT : energía térmica, donde R es la constante de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin) bajo cualquier condición, lo que conduce a un proceso de plegamiento que es simplemente difusivo e implica una transición de desplegamiento de equilibrio continua en todo el proceso (Muñoz 2007; Liu *et al.* 2012).

1.2. Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs)

Hoy día se sabe que una fracción significativa de los genomas, particularmente eucariotas, codifica proteínas con regiones que carecen de estructura terciaria definida bajo condiciones fisiológicas (Dunker, Brown *et al.* 2002). Este grupo de proteínas se denomina **proteínas intrínsecamente desordenadas** (IDPs, del inglés *Intrinsically Disordered Proteins*). En general, las IDPs interaccionan con un ligando diana (a menudo ADN) y, al unirse, sufren una transición estructural a una forma parcialmente plegada (Fuxreiter *et al.* 2004), necesaria para llevar a cabo su función (Wright y Dyson 1999) (**Fig. 1-5**).

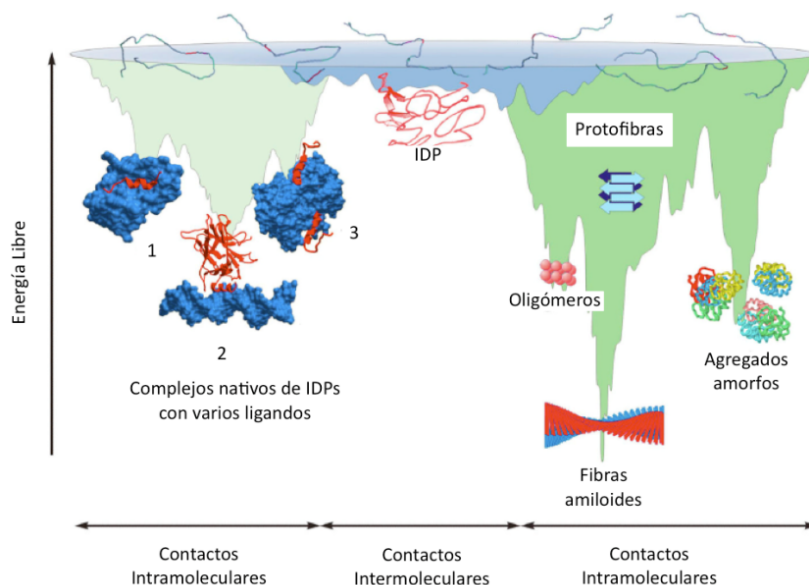


Figura 1-5. Proteínas intrínsecamente desordenadas. Muchas proteínas nativas con diversas funciones biológicas carecen de estructura globular compacta en solución acuosa; sin embargo, tienden a adquirir una estructura ordenada al interactuar con ligandos específicos, siempre que la formación de tales complejos suponga una disminución en energía libre (1-3). A diferencia de las proteínas globulares, las IDPs no requieren un desplegamiento previo para generar interacciones intermoleculares y en algunos casos pueden conducir a agregación amiloide. Esto requiere condiciones especiales que promuevan la formación de conformaciones amiloidogénicas, estructuralmente ordenadas. Además de fibras amiloides, pueden auto-polimerizar para formar otro tipo de agregados, sin que haya un prerequisite conformacional especial para que ocurra, como los agregados amorfos. Figura modificada de Turoverov *et al.* 2010.

Las IDPs se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellas que están completamente desordenadas en toda su longitud (a menudo llamadas NUPs, del inglés *Natively Unfolded Proteins*) y aquellas que tienen extensas (>30-40 residuos) regiones desordenadas dentro de una proteína plegada. Las NUPs, a su vez, pueden subdividirse en dos grupos; las que no tienen elementos de estructura secundaria y aquellas con estructura secundaria como ocurre en los glóbulos fundidos (Uversky 2002). Aunque las NUPs pueden presentar propiedades biofísicas consistentes con una molécula totalmente desplegada, estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) han demostrado que regiones desordenadas muestran una alta propensión a formar estructuras residuales, que puede resultar crucial para la interacción con su(s) ligando(s) (Bussell y Eliezer 2001).

1.2.1. Un nuevo paradigma proteico: la “trinidad proteica”

Desde el descubrimiento de las IDPs, ha aumentado la estimación de la fracción de proteínas o dominios proteicos en los que el estado funcional es desestructurado, parcial- o totalmente, sin interacciones de largo alcance que mantengan una estructura definida. Las regiones desordenadas se componen como un conjunto de conformaciones con ángulos diedros Φ y Ψ de Ramachandran dinámicos a lo largo del esqueleto polipeptídico, en lugar de adoptar valores restringidos (Dunker *et al.* 2002). Desde entonces, un cambio substancial se ha producido en el paradigma tradicional del plegamiento proteico. Una visión alternativa al paradigma clásico es la “**trinidad proteica**” (*protein trinity*, Dunker *et al.* 2001), donde la estructura nativa puede corresponder a tres estados termodinámicos diferentes y la función podría derivar de cualquiera de ellos o de formas transitorias entre ellos (Fig. 1-6).

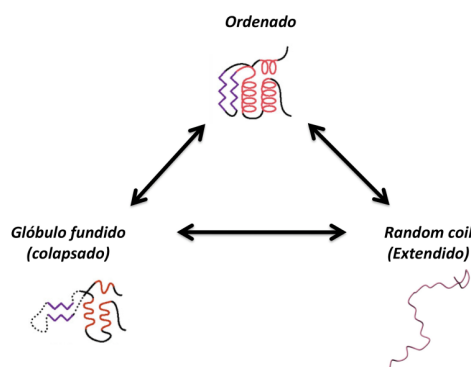


Figura 1-6. Trinidad Proteica. La proteína nativa puede existir en uno de los tres estados termodinámicos: ordenado, colapsado o extendido.

1.2.2. IDPs y proteoma. ¿Por qué existen las IDPs?

Predicciones computacionales basadas en el estudio de 29 genomas de eubacterias, arqueas y eucariotas, han mostrado que el 33,0% de las proteínas eucariotas contienen regiones desordenadas de longitud mayor de 30 residuos consecutivos, fracción que es muy superior a la encontrada en eubacterias (4,2%) o arqueas (2,0%) (Fig. 1-7). Un análisis del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* mediante ontología de genes muestra que muchas de las funciones asociadas con regiones desordenadas son específicas de eucariotas, como es el caso de organización y biogénesis del citoesqueleto (Ward *et al.* 2004). Estos resultados teóricos son consistentes con datos experimentales que indican que las IDPs son muy comunes en eucariotas, pero no tanto en procariotas.

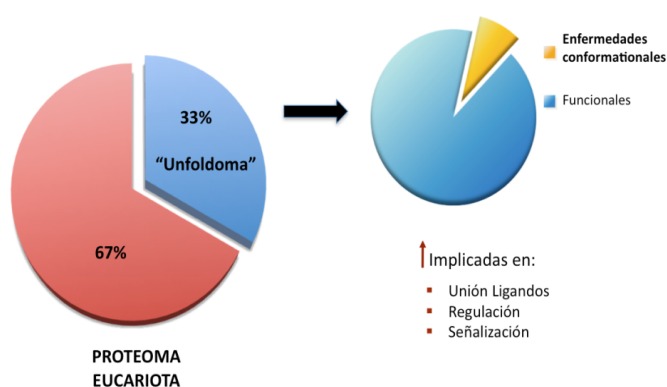


Figura 1-7. Proporción y funcionalidad de IDPs en el proteoma eucariota. Segmentos desordenados putativos se encuentran en el 2,0%, 4,2% y 33,0% de las proteínas codificadas en arqueas, eubacterias y eucariotas, respectivamente (unfoldoma). Las IDPs llevan a cabo funciones críticas para la célula y se han encontrado también asociadas a enfermedades conformacionales.

La fracción de proteoma que incluye todas las IDPs, “**unfoldoma**”, es una parte crítica ya que provee funciones biológicas esenciales (Dunker *et al.* 2000) que complementan las funciones que realizan proteínas ordenadas, incluyendo funciones relacionadas con procesos de endocitosis, unión a ácidos nucleicos (Ward *et al.* 2004) o un papel crítico en la señalización celular eucariótica (Uversky *et al.* 2005) (**Fig. 1-7**). El análisis genómico indica que la proporción de genoma que codifica para IDPs aumenta con la complejidad de los organismos (Dunker *et al.* 2000; Tompa 2003). Asimismo, el análisis de 126 secuencias desordenadas muestra el predominio de repeticiones en tándem de IDPs respecto al resto de proteínas, reflejando una fuerte actividad evolutiva (Tompa 2003).

Varias hipótesis se han propuesto para explicar su abundancia. La más favorecida propone que las IDPs son más maleables, lo que presenta indudables ventajas con respecto a la regulación y unión a diversos ligandos. A su vez, las IDPs proporcionan una solución simple para tener superficies de interacción grandes con proteínas pequeñas, genomas pequeños y tamaños celulares pequeños (Gunasekaran *et al.* 2003).

1.2.3. Relación entre IDPs y amiloidosis/neurodegeneración

La mayor parte de las IDPs desempeñan funciones clave para la célula y también se han encontrado asociadas a varias **enfermedades conformacionales** humanas, tales como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y especialmente **enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas**. Dentro de éstas, los ejemplos más representativos son el péptido β -amiloide ($A\beta$) y la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer, la proteína priónica PrP_{sc} en las encefalopatías espongiformes transmisibles, α -sinucleína (α -syn) en la enfermedad de Parkinson y poliglutaminas, polyQs, en la enfermedad de Huntington y otros desórdenes (**Fig. 1-8**). Esto ha motivado la aparición de un nuevo concepto: **desorden en desórdenes** (*disorder in disorders*) o **concepto D²** (Uversky *et al.* 2008). De acuerdo a esta idea, la predicción y el análisis del desorden en proteínas podría ayudar a comprender a nivel molecular el origen y desarrollo de las enfermedades conformacionales en las que se encuentran implicadas.

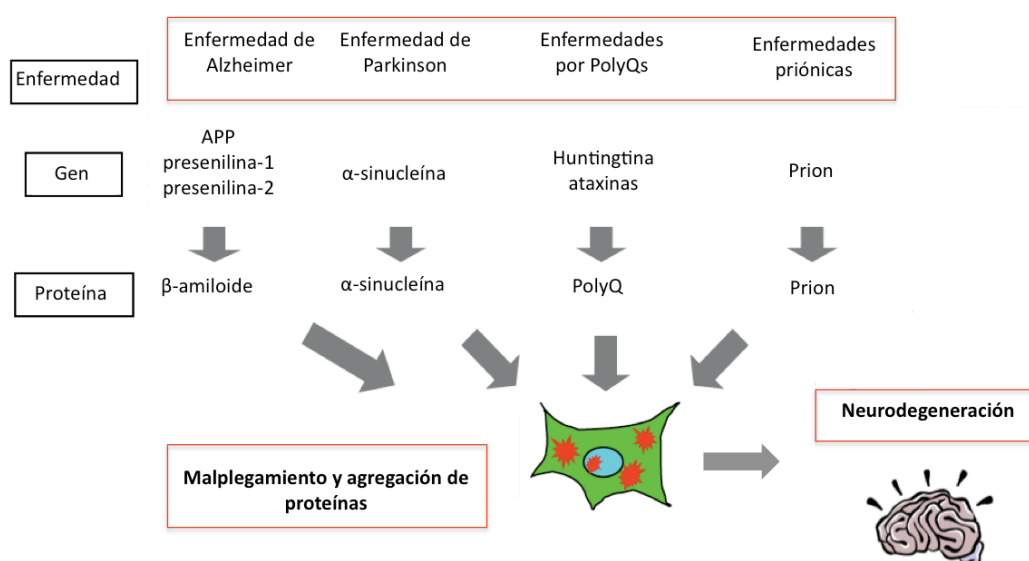


Figura 1-8. Enfermedades neurodegenerativas causadas por mal plegamiento y agregación como causa molecular común. Mutaciones genéticas responsables de formas hereditarias de varias enfermedades neurodegenerativas hacen que las proteínas tiendan a plegarse de manera anómala, lo que conduce a la sobreproducción de proteínas propensas a agregar, que son acumuladas en forma de inclusiones en el interior y exterior de neuronas de cerebros enfermos y eventualmente desencadenan el proceso de neurodegeneración. Dichas enfermedades se conocen como "enfermedades de mal plegamiento" (Ross y Poirier 2005), donde el malplegamiento proteico supone una etapa crucial en la patogénesis. Figura modificada de Popiel *et al.* 2011.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de trastornos causados por la degeneración progresiva de neuronas en diferentes áreas del cerebro, específicas para cada trastorno, que resulta en diversos síntomas neurológicos y psiquiátricos. Hasta la fecha, sólo se han descrito terapias paliativas, lo que probablemente obedezca al hecho de que la causa molecular subyacente a la neurodegeneración continúa sin conocerse. Sin embargo, existen evidencias que indican que muchas de estas enfermedades comparten un mecanismo patogénico común (Popiel *et al.* 2011) (**Fig. 1-9**). Una de las características más destacadas ha sido la observación (en estudios patológicos y bioquímicos) de acúmulos de proteína mal plegada y agregada, conocidos como **cuerpos de inclusión**, que se acumulan dentro y fuera de las neuronas de cerebros enfermos, como es el caso de placas seniles (compuestas por $A\beta$) y ovillos neurofibrilares (formados por tau) en la enfermedad de Alzheimer; o cuerpos de Lewy, formados por α -syn en la enfermedad de Parkinson. Las **fibras amiloides** de los cuerpos de inclusión de distintos orígenes tienen una morfología y estructura similar denominada **columna cruzada β** (Sipe y Cohen 2000; Sawaya *et al.* 2007), determinada por difracción de rayos X. Consiste en de 2 a 6 protofilamentos de 2 a 5 nm de diámetro asociados lateralmente o enrollados entre ellos para formar fibras de 4 a 13 nm de diámetro (**Fig. 1-10**).

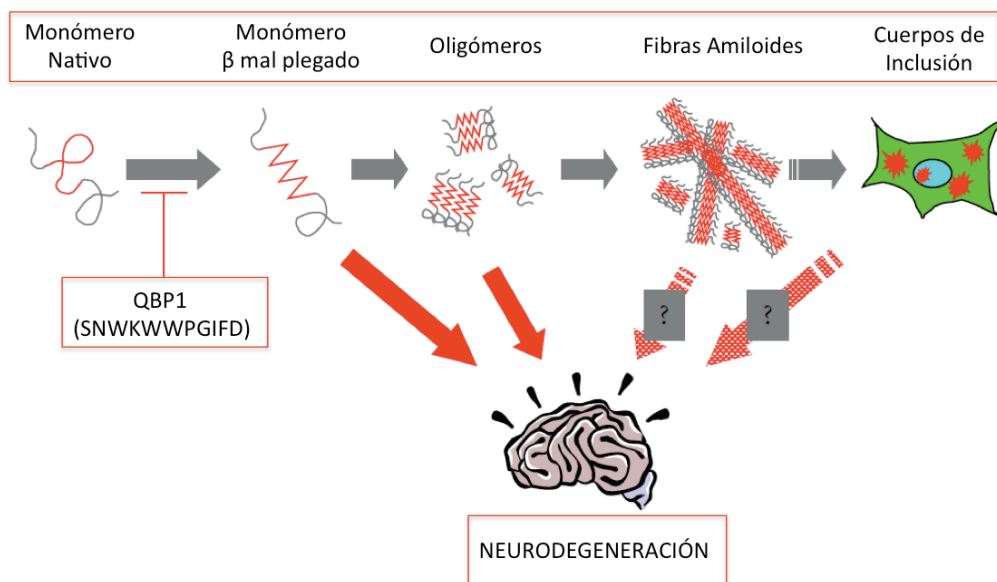


Figura 1-9. Patogénesis molecular de las enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas. Las proteínas implicadas, propensas a plegarse erróneamente, pueden generar una estructura rica en estructura β , que desencadena la cascada de agregación proteica formando oligómeros y agregados amiloides fibrilares, seguido por su acumulación en forma de cuerpos de inclusión. Los signos de interrogación indican las especies cuyo papel en la citotoxicidad sigue siendo controvertido. El péptido QBP1 será introducido en la siguiente sección. Figura modificada de Popiel *et al.* 2011.

Como mecanismo patogénico común a nivel molecular para enfermedades amiloidogénicas neurodegenerativas, se ha propuesto que el monómero de las proteínas implicadas, denominadas **proteínas neurotóxicas** (NPs, del inglés *Neurotoxic Proteins*), sufre un cambio conformacional que origina un monómero rico en estructura β (intermedio mal plegado) que desencadena la cascada de agregación, acumulándose finalmente como cuerpos de inclusión dentro o fuera de las neuronas, lo que se asocia con la neurodegeneración (**Fig. 1-9**). A día de hoy persiste todavía un debate respecto a qué especies de la cascada son las tóxicas para la célula. Sin embargo, la hipótesis más favorecida considera a agregados solubles (oligómeros) como los agentes etiológicos más importantes (Bucciantini *et al.* 2002; Kirkitadze *et al.* 2002), mientras que las fibras amiloides no jugarían un papel causal (Kirkitadze *et al.* 2002). De hecho, actualmente hay evidencias que ponen de manifiesto un papel protector de las fibras, secuestrando a precursores tóxicos solubles. El monómero mal plegado también podría ejercer un efecto tóxico en la célula, al menos en el caso polyQs expandidas (Nagai *et al.* 2007).

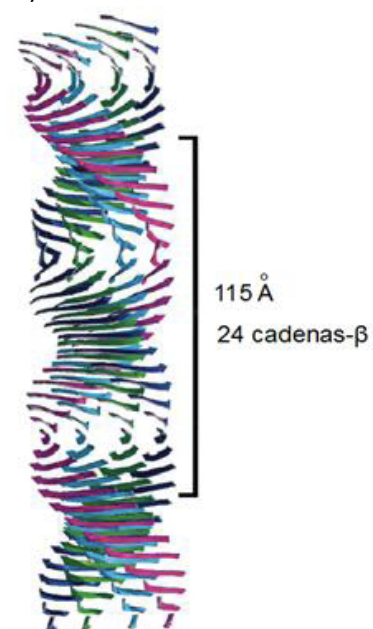


Figura 1-10. Modelo de la estructura del núcleo de una fibra amiloide. Un número de láminas β (cuatro en la imagen) forma la estructura del protofilamento. Estas láminas se disponen en paralelo al eje del protofilamento, con sus cadenas β perpendiculares al eje fibrilar. Dado el giro normal de las cadenas β , las láminas β giran alrededor de un eje helicoidal común que coincide con el eje del protofilamento, con una repetición helicoidal de 115,5 Å que contiene 24 cadenas β . Los datos de difracción de rayos X de las fibras indican que las láminas β en el amiloide probablemente contengan una mezcla de láminas β en disposición paralela y antiparalela, pero la proporción de las mismas no ha podido ser determinada. Figura modificada de Serpell *et al.* 1997.

El mecanismo patogénico ilustrado en la **Figura 1-9** se encuentra ampliamente documentado para el caso de las poliglutaminas (Nagai y Popiel 2008; Bauer y Nukina 2009). En este caso, varias proteínas celulares se asocian con la polyQ agregada en los cuerpos de inclusión. Estas proteínas incluyen factores de transcripción (Shimohata *et al.* 2000; Nucifora *et al.* 2001), chaperonas moleculares (Cummings *et al.* 1998; Chai *et al.* 1999), proteínas del citoesqueleto (Nagai *et al.* 1999), y subunidades proteasomales (Cummings *et al.* 1998). Se piensa que estas asociaciones anormales desempeñan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, produciendo una disfunción en los procesos celulares que implican a estas proteínas. En consecuencia, se han diseñado aproximaciones terapéuticas dirigidas a cada proceso celular comprometido en la enfermedad (Di Prospero y Fischbeck 2005; Shao y Diamond 2007). Sin embargo, han resultado en efectos terapéuticos bastante limitados, debido a los numerosos procesos celulares que se ven afectados (Bence *et al.* 2001; Steffan *et al.* 2001; Gunawardena *et al.* 2003; Szebenyi *et al.* 2003). En contraste con estos acontecimientos tardíos,

el mal plegamiento y la agregación proteica suponen eventos iniciales de la cascada patogénica, resultando ideales como dianas terapéuticas (Bates 2003; Nagai y Popiel 2008).

1.2.4 QBP1: un péptido inhibidor de la amiloidogénesis

En el año 2000, el grupo de Yoshitaka Nagai identificó, mediante un screening de fagos, el denominado **péptido de unión a PolyQ 1** (QBP1, PolyQ-binding peptide 1, SNWKWWPGIFD), capaz de unirse selectivamente a tractos expandidos de polyQs (Nagai *et al.* 2000). Este péptido posee un núcleo mínimo de 8 aminoácidos con capacidad inhibitoria (WKWWPGIF), determinado por estudios de truncación de los terminales N y C. Mediante un escaneo de alaninas se vio además que la secuencia rica en W es esencial para la unión y actividad inhibitoria lo que sugiere que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en su unión al fragmento expandido de polyQ (Tomita *et al.* 2009). Sin embargo, el mecanismo molecular de unión entre QBP1 y polyQs expandidas no se conoce. Esta cuestión se ha intentado abordar mediante estudios de dinámica molecular (Armen *et al.* 2005) que indican el establecimiento de una red de enlaces de hidrógeno entre los grupos amida del motivo WKWW con los grupos carbonilos del esqueleto peptídico de la polyQ, tras una reorganización de las cadenas laterales del péptido. Además, se observa la formación de enlaces de hidrógeno entre la cadena lateral de los residuos de Q3, Q7, Q9 y Q12 con el esqueleto peptídico de los residuos GIFD (Armen *et al.* 2005) (**Fig. 1-11**). La unión diferencial ha sido caracterizada experimentalmente mediante resonancia de plasmón superficial (Okamoto *et al.* 2009), encontrando que QBP1 se une selectivamente a proteínas con tractos expandidos de polyQs (Thioredoxina-Q₆₂, thio-Q₆₂), con una constante de equilibrio de disociación (Kd) de 5.7 μ M, mientras que no se une a fragmentos no expandidos (thio-Q₁₉).

Mediante un análisis por dicroísmo circular (CD) se mostró que QBP1 inhibe la transición conformacional hacia el monómero rico en estructura tipo β (Nagai *et al.* 2007), actuando al comienzo de la **cascada de agregación** proteica, por lo que su posible uso como agente terapéutico resulta muy interesante (**Fig. 1-9**). Este péptido es capaz de inhibir *in vitro* la agregación de thio-Q₆₂, un sistema que mimetiza las características *in vivo* de las enfermedades causadas por polyQs, en una manera dependiente de concentración. Mientras que un péptido con la misma composición de aminoácidos, pero distinta secuencia (SCR, *scrambled*), no tiene ningún efecto sobre la agregación de los fragmentos de polyQs. *In vivo*, se ha visto que es capaz de suprimir la neurodegeneración del ojo mediada por polyQs en un modelo transgénico de *Drosophila melanogaster*, lo que aumenta significativamente su esperanza de vida (Nagai *et al.* 2003).

Para lograr establecer una terapia realista, el péptido tiene que ser suministrado de manera exógena, en lugar de ser usado de manera transgénica. Sin embargo, QBP1 es un péptido demasiado grande para atravesar la membrana celular de manera eficiente y poder entrar en las células. Para habilitar la entrada eficiente intracelular de QBP1, se han utilizado **dominios de transducción proteicos**, secuencias de péptidos capaces de penetrar en la célula atravesando la membrana. La administración oral de QBP1 fusionado al péptido Antennapedia ("penetratina"), para su internalización, retrasa considerablemente la muerte prematura de la mosca en comparación con el péptido control Antp-scrambled. Además, dichas moscas

presentaban un número de cuerpos de inclusión significativamente menor que las moscas control (Popiel *et al.* 2007). Sin embargo, no se observó el mismo efecto en ratón, donde parece que Antp-QBP1 no es capaz de cruzar de manera eficiente la barrera hematoencefálica (Popiel *et al.* 2009). En ratones, QBP1 ha sido usado recientemente como herramienta de reconocimiento de expansiones patológicas de polyQs para su degradación específica por autofagia mediada por chaperonas (Bauer *et al.* 2010), al fusionarlo junto a motivos de unión a Hsc70, que reconoce y libera proteínas sustrato para su degradación lisosomal.

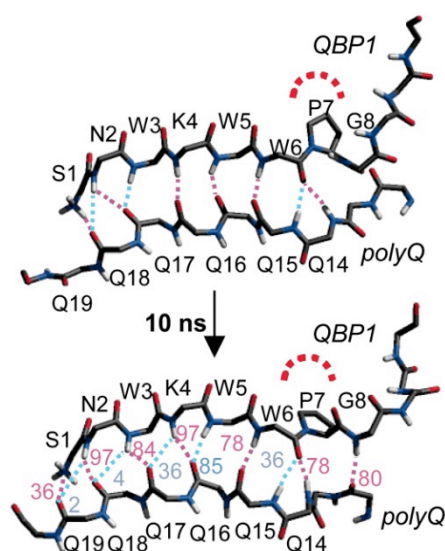


Figura 1-11. Modelo del complejo QBP1-polyQ.

Se muestra la conformación inicial minimizada del complejo (superior) y la conformación después de 10 ns de dinámica libre (parte inferior). Los enlaces de hidrógeno predominantes durante la simulación se muestran en morado, y los menos predominantes en azul claro. El número indica el porcentaje de tiempo en que el enlace de hidrógeno está formado entre los 6 y 10 ns de simulación. La unión de una cadena adicional de polyQ a la cara carbonilo del QBP1 no es probable debido al impedimento estérico de la cadena lateral de la prolina (en rojo), inhibiendo el crecimiento del núcleo de agregación. Figura tomada de Armen *et al.* 2005.

1.2.5. Análisis de IDPs: técnicas monomoleculares vs. poblacionales

Las IDPs presentan propiedades estructurales distintivas que pueden ser usadas para su identificación mediante **técnicas clásicas**, como sensibilidad a digestión por proteasas, insensibilidad a condiciones desnaturalizantes, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopía de CD y determinación del radio de Stokes usando cromatografía de exclusión molecular o dispersión de rayos X a bajo ángulo. Por otra parte, las IDPs también pueden fácilmente distinguirse de las proteínas estructuradas usando **herramientas computacionales** basadas en la hidrofobicidad media respecto a la carga neta de ambos tipos de proteínas (Uversky *et al.* 2009). En el caso de las IDPs implicadas en las **amiloidosis**, las **fluctuaciones conformacionales** del monómero juegan un papel esencial para promover la formación de agregados iniciales tóxicos, críticamente relacionados con el desarrollo de la enfermedad (Dunker *et al.* 2001). Aunque el NMR en estado sólido y la cristalografía de rayos X han proporcionado información estructural muy valiosa sobre las fibras amiloides maduras (Sawaya *et al.* 2007; Tycko 2011), la heterogeneidad de la muestra debida a dicha fluctuación entre conformaciones y naturaleza transitoria de intermedios parcialmente plegados en la vía amiloidogénica impide su caracterización estructural por técnicas biofísicas tradicionales. Dichas técnicas emplean **poblaciones moleculares**, de forma que las propiedades de todas las moléculas en la muestra contribuyen a la señal observada, que representa por tanto un **promedio poblacional** sobre el conjunto de moléculas N (donde N es típicamente un

gran número de moléculas cercano al número de Avogadro). En esta población promediada, las principales contribuciones dominan de tal manera que los efectos de las contribuciones menores están ocultos a la señal, anulados en su mayoría por las fluctuaciones del sistema perdiendo la información sobre procesos transitorios. Esta pérdida de información es consecuencia del **teorema central del límite** que indica que la media de una suma de variables aleatorias e independientes lo suficientemente grande se aproxima a una curva gaussiana (Hoel 1984) (**Fig. 1-12**).

Una de las características diferenciales de las **técnicas monomoleculares** es que reportan la distribución de valores para una propiedad dada. De acuerdo con el **principio ergódico**, el comportamiento medio de una sola molécula en una ubicación dada durante tiempos de escala suficientemente largos, ofrece una descripción del sistema de precisión comparable a la obtenida a partir del análisis de un conjunto de moléculas independientes, idénticas y medidas una única vez cada una (Matsunaga y Komatsuzaki 2004). La identificación explícita que surge a partir de una sola molécula se aproxima a una **descripción más rica y precisa** del comportamiento del sistema que la aproximación poblacional. Así pues, las técnicas monomoleculares, monitorizan **fluctuaciones moleculares** y nos aportan una descripción de la distribución y dinámica de ciertas propiedades, no sólo el **comportamiento promedio de la población** (Deniz *et al.* 2000; Deniz *et al.* 2001; Schuler *et al.* 2002; Schuler 2005; Tinnefeld y Sauer 2005; Bilsel y Matthews 2006; Michalet *et al.* 2006). Esto permite la observación de moléculas que coexisten en varios estados (distribución multimodal, que da acceso a la heterogeneidad molecular) y la detección de moléculas que se encuentran en estados lejanos de la media poblacional (**Fig. 1-12**). Estas fluctuaciones son en última instancia las que caracterizan la naturaleza estadística de cada propiedad, como ocurre en el caso de IDPs, en cuyo estudio dos tipos de técnicas monomoleculares han resultado particularmente útiles: a) métodos de **fluorescencia de moléculas individuales** (como transferencia de energía de resonancia Förster y espectroscopía de correlación de fluorescencia) para estudiar la dinámica de monómeros (Ferreon *et al.* 2010) y b) la **espectroscopía de fuerzas de moléculas individuales** (SMFS, del inglés *Single-Molecule Force Spectroscopy*) basada en el microscopio de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscope*, SMFS-AFM), técnica de manipulación de molécula individual (MMI) usada para investigar el **polimorfismo conformacional mecánico** de estas proteínas (Hervás *et al.* 2012).

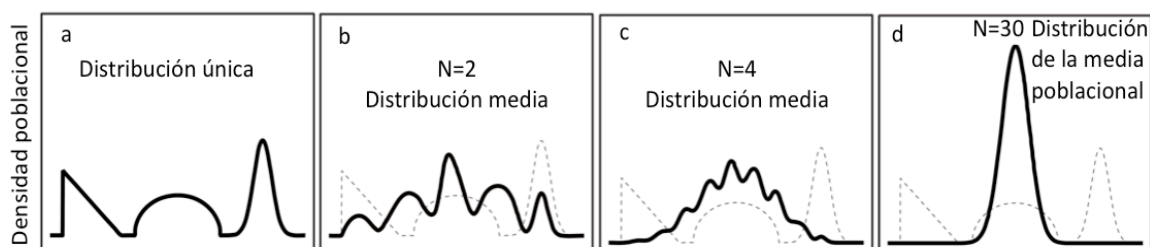


Figura 1-12. Técnicas monomoleculares vs. poblacionales. Densidad de probabilidad de una variable aleatoria x imaginaria para una muestra única (a) y para N muestras promediadas (b-d). Observamos una variable x con una densidad de probabilidades con 3 sub-distribuciones (a). Cuando se observan múltiples muestras al mismo tiempo (b-d) la forma original de la distribución (línea continua) se pierde y la distribución observada tiende a una gaussiana, como predice el teorema central del límite.

1.3 Mecánica monomolecular de proteínas

En la última década se ha producido el desarrollo de una serie de técnicas que permiten el estudio y manipulación de biomoléculas individuales. La capacidad de manipulación de la maquinaria que controla los procesos biológicos a este nivel fundamental ha dado lugar a una comprensión más profunda de mecanismos moleculares subyacentes en diversos procesos celulares.

1.3.1. Fuerza, un parámetro clave en biología. Proteínas con función mecánica

Desde tiempos de Isaac Newton, se sabe que la **fuerza** es un parámetro que gobierna el movimiento de los cuerpos. Sin embargo, en biología, la fuerza emergió como un componente activo en muchos procesos celulares en la década de los 80. Desde entonces, se ha desarrollado nueva metodología e instrumentación que permite medir directamente las fuerzas a nivel de las moléculas individuales y/o sus complejos (Bustamante *et al.* 2000; Carrión-Vázquez *et al.* 2006). Las células presentan la capacidad de detectar estímulos mecánicos externos, y reaccionar en consecuencia. Para ello, presentan complejos específicos de proteínas que actúan como transductores mecano-sensibles que, traduciendo fuerzas mecánicas en respuestas bioquímicas que pueden modular procesos celulares vitales como la contracción muscular, el movimiento celular, la señalización celular, procesos de división o de transporte celular, y en el desarrollo de órganos (Bustamante *et al.* 2004; Grater *et al.* 2005; Vogel y Sheetz 2006; Johnson *et al.* 2007). Por tanto, cualquier modificación en las propiedades mecánicas de las proteínas implicadas que interrumpa o perturbe esta vía podría reflejarse en una alteración de la actividad celular, lo que podría resultar en diversas enfermedades como pérdida de audición, trastornos cardiovasculares, distrofia muscular u osteoporosis (Vogel 2009; Kazmierczak y Muller 2012).

Las proteínas actúan en diversos procesos fisiológicos o patológicos mecánicos a modo de **bionanomáquinas** que se pueden clasificar en: 1) sensores (incluyendo interruptores mecánicos), transmisores, resistencias y 2) motores (actuadores). Dentro del grupo 1 parece que proteínas con función mecánica han evolucionado para resistir, transmitir o detectar fuerzas, de manera que su estabilidad mecánica es una propiedad crítica para su función fisiológica. Ciertas proteínas de este grupo 1 presentan sustratos activables por fuerza, que habitualmente incluyen sitios crípticos. En el grupo 2 se engloban maquinarias celulares encargadas de asistir al plegamiento (chaperonas), traslocar proteínas a orgánulos (traslocasas mitocondriales o cloroplásticas) o desnaturalizar proteínas (subunidad reguladora del proteasoma). Todas ellas tienen un papel mecánico muy importante, desplegando sus proteínas sustrato a través de subunidades AAA+ ATPasas mediante fuerzas generadas a partir de energía química proveniente de la hidrólisis de ATP (Shtilerman *et al.* 1999; Valpuesta *et al.* 2002; Sauer *et al.* 2004), como ha sido recientemente demostrado experimentalmente (Aubin-Tam *et al.* 2011; Maillard *et al.* 2011). Dada la gran cantidad de proteínas celulares procesadas por estas maquinarias en alguna fase de su ciclo funcional, es lógico pensar que las propiedades mecánicas de todas estas proteínas puedan resultar críticas para su funcionalidad, pudiendo incluso desencadenar procesos patológicos. Finalmente, las fuerzas mecánicas podrían subyacer

también en la actividad de enzimas, de acuerdo con la hipótesis no verificada experimentalmente de John Haldane y Linus Pauling, donde se postula que la catálisis enzimática se produce induciendo tensión mecánica en el complejo enzima-sustrato (revisado por Bustamante *et al.* 2004).

1.3.2. Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM): Invención y usos

Una característica general de todas las **técnicas de barrido mediante sonda** (SPM, del inglés *Scanning Probe Microscopy*), entre las que está el **AFM**, es la presencia de un brazo flexible que interactúa a través de una punta directamente con la superficie de la muestra. Esto nos permite estudiar detalles de la muestra a escala nanoscópica, obteniendo información de otro modo inaccesible. El AFM fue desarrollado para superar una limitación básica que presentaba el antepasado de todos los SPM, el **microscopio de efecto túnel** (STM, del inglés *Scanning Tunnel Microscope*, desarrollado en 1982 por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer en IBM Zurich, galardonados con el premio Nobel de Física 1986 por su invención). Mientras que el STM sólo permite adquirir imágenes sobre superficies conductoras o semiconductoras (Binnig *et al.* 1985), el AFM, inventado por Gerd Binnig, Calvin Quate y Christoph Gerber en 1985, tiene la ventaja de poder mapear la **topografía** de casi cualquier superficie a resolución atómica, incluyendo muestras biológicas en líquidos (Binnig *et al.* 1986). El AFM es un aparato relativamente simple que emplea un transductor de fuerza mecánica basado en un sensor (**micropalanca** o *cantilever*) que termina en una punta fina, la cual contacta directamente con la muestra (**Fig. 1-13**). Las **fuerzas** son calculadas en base a la deflexión de la micropalanca, y las **distancias** se infieren con alta resolución en base al desplazamiento del posicionador piezoeléctrico. La **resolución espacial en el eje Z**, dirección normal a la superficie, debido a la gran precisión en la medida de la posición del actuador piezoeléctrico (cuya respuesta es lineal gracias a un sensor capacitivo) puede llegar a valores menores de 1 nm. En cuanto a la **resolución en el plano XY**, está limitada por el radio mínimo de la punta utilizada para escanear la superficie, que suele oscilar entre 2 y 50 nm aproximadamente. Por tanto, la **resolución lateral** de un AFM dependerá fundamentalmente del estado de la punta y, en las mejores condiciones, podremos tener una resolución de unos 5 a 10 nm en medio fisiológico.

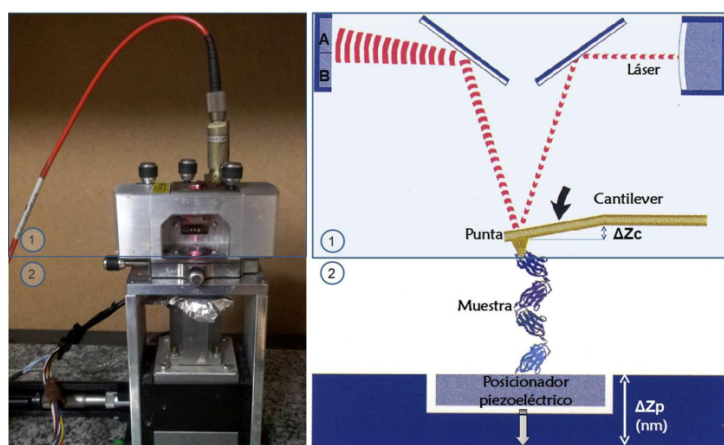


Figura 1-13. El microscopio de fuerzas atómicas. El AFM consta básicamente de dos partes: una cabeza sensora (1) y un posicionador piezoeléctrico (2). Sobre éste último se deposita la muestra, y la punta del

sensor presente en la cabeza entra en contacto directo con ella. Al mover el posicionador una distancia conocida (Δz_p) la punta se moverá (Δz_c) en relación a las diferentes alturas presentes en la muestra o a la resistencia al estiramiento de una molécula anclada. El haz de láser que refleja sobre la micropalanca hasta un fotodiodo reproduciendo el movimiento de la punta y generando una señal de voltaje que se traduce finalmente a fuerza. (izquierda: fotografía tomada en el laboratorio; derecha: imagen modificada de Fisher *et al.* 1999).

1.3.2.1. Modo de espectroscopía de fuerzas de moléculas individuales (SMFS)

Como se ha introducido previamente, una aplicación típica del AFM es la medida de **propiedades nanomecánicas** de materiales inmovilizados sobre la superficie tras someterlos a estrés mecánico o estiramiento (Burnham y Colton 1989). Este instrumento se ha empleado tanto para desplegar mecánicamente biopolímeros, como para determinar fuerzas de interacción de pares de biomoléculas interaccionantes (Carrión-Vázquez *et al.* 2006). Esta modalidad, SMFS, permite medir fuerzas con una sensibilidad de decenas de pN y cambios en longitud (distancias) con resolución de nm con una resolución temporal inferior al milisegundo (10^{-3} s). Todo ello hace que el AFM-SMFS sea un método idóneo para el análisis nanomecánico de moléculas individuales, lo que ha permitido calcular fuerzas de unión de hebras complementarias de DNA (Lee *et al.* 1994), de interacción de sistemas ligando-receptor (Florin *et al.* 1994), fuerzas que mantienen la conformación de anillos monoméricos de polisacáridos (Rief *et al.* 1997), y las fuerzas de desplegamiento de módulos de una proteína modular (Rief *et al.* 1997). Posteriormente esta técnica se ha generalizado para el estudio del desplegamiento de todo tipo de proteínas (Carrión-Vázquez *et al.* 2006) y la ruptura de interacciones entre pares de biomoléculas (Weisel *et al.* 2003). El trabajo desarrollado durante esta tesis se centra exclusivamente en el desplegamiento mecánico de proteínas individuales, rompiendo interacciones intramoleculares que mantienen el plegamiento parcial (estructuras transitorias) de IDPs. Por ello, esta introducción se centra en el uso de SMFS para el estudio de interacciones intramoleculares, con escasa mención a aspectos relacionados con las interacciones intermoleculares (**Fig. 1-14**).

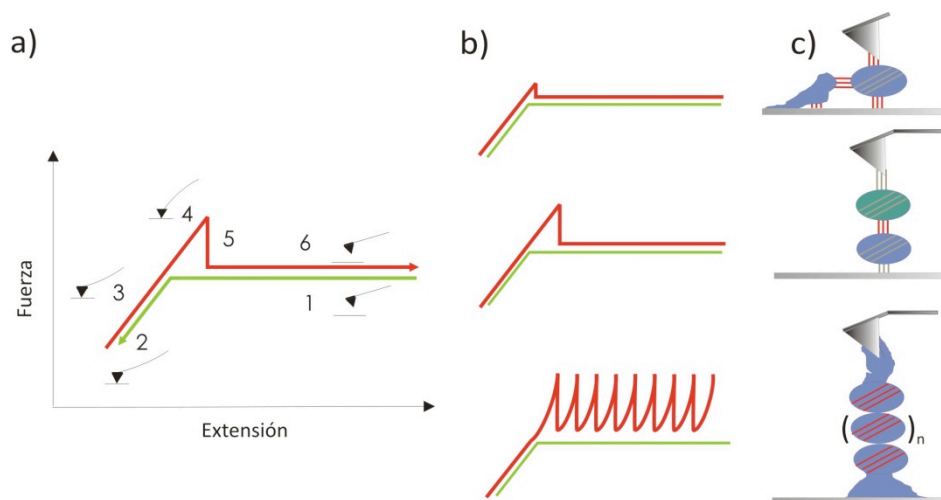


Figura 1-14. Espectros fuerza-extensión en SMFS. a) Ciclo de aproximación-alejamiento de la punta con respecto a la superficie y aspecto del espectro fuerza-extensión correspondiente. (1) Cuando la punta no está en contacto con la superficie, (2) cuando la punta entra en contacto con la superficie, lo que causa

una curvatura en la micropalanca, (3) cuando la superficie se aleja de la punta, lo que causa una curvatura de la micropalanca en la dirección contraria por la adhesión punta-superficie, hasta generar un pico de fuerza (4), cuando está suficientemente alejado como para reducir interacciones (5) hasta alejarse completamente (6). **b)** Diagramas esquemáticos de espectros fuerza-extensión característicos: interacciones inespecíficas, interacciones específicas entre un par interaccionante y espectro de desplegamiento en “dientes de sierra” de una proteína compuesta por repeticiones (de arriba a abajo, respectivamente). **c)** Dibujo representativo de lo mostrado en **b**.

1.3.2.1.1 Principio físico

Como se ha introducido anteriormente, el AFM transduce las fuerzas ejercidas sobre la micropalanca midiendo las desviaciones angulares sobre un fotodiodo de un haz de láser que se refleja sobre ella (**Fig. 1-13**). Dichas diferencias de voltaje deben transformarse en fuerza para poder obtener un **espectro fuerza-extensión** (**Fig. 1-14**). Dado que la micropalanca del AFM se comporta como un muelle Hookeano, siguiendo la **ley de Hooke**, la fuerza se puede calcular como:

$$\text{Ec. 1-1} \quad F = -k \Delta z_c,$$

donde k es la **constante elástica** de la micropalanca y Δz_c su desplazamiento a lo largo del eje z (**Fig. 1-13**). Por tanto, para poder transformar la señal de voltaje (ΔV) y el desplazamiento del piezoeléctrico (Δz_p) en fuerza y extensión, respectivamente, necesitamos determinar el valor de la constante k y de Δz_c .

La relación entre la señal de voltaje detectada por el fotodiodo y el desplazamiento del piezoeléctrico ($\Delta V/\Delta z_p$) se determina realizando un **ciclo de aproximación-alejamiento** sobre un sustrato duro no deformable (normalmente sustratos de vidrio o mica) y midiendo la pendiente de ΔV vs. Δz_p a altas fuerzas aplicadas. En estas condiciones el desplazamiento de la micropalanca, Δz_c , se iguala al del piezoeléctrico, Δz_p . El valor de esta pendiente se denomina **factor de sensibilidad** C , y depende del tamaño del spot del láser en el fotodiodo y del índice de refracción del medio experimental. Así podemos transformar la señal de voltaje del fotodiodo en deflexión de la micropalanca, Δz_c :

$$\text{Ec. 1-2} \quad \Delta z_c = \Delta z_p = \Delta V / C$$

Una vez conozcamos la K de la micropalanca, podemos calcular el valor de la fuerza a partir de la Ec. 1-1. El método más empleado para calcularla es el denominado “**método térmico**”, en el que la micropalanca se modeliza como un oscilador armónico fluctuando en respuesta al **ruido térmico** (ver **Sección 8.1.1.1**). Las propiedades mecánicas de la micropalanca están relacionadas con la frecuencia y amplitud de estas oscilaciones, de tal manera que podemos calcular su constante k usando el denominado **teorema de equipartición**:

$$\text{Ec. 1-3} \quad \langle \Delta x^2 \rangle = k_B T / k,$$

donde el primer miembro de la ecuación representa el desplazamiento cuadrático medio de la micropalanca debido al ruido térmico (Hutter y Bechhoffer 1993; Florin *et al.* 1995). La constante k de la micropalanca normalmente se encuentra en el rango de 10-100 pN·nm⁻¹. Para una micropalanca típica de 60 pN·nm⁻¹ el ruido térmico en los experimentos de SMFS es aproximadamente de 16 pN (las fluctuaciones cuadráticas medias de fuerza, (Bustamante *et al.* 2000)). Por tanto, utilizando micropalancas con estos valores de k , nos aseguramos que **la macromolécula es el componente elástico dominante** del sistema.

Para el análisis nanomecánico de proteínas por SMFS, es necesario que la molécula a analizar se encuentre anclada tanto al sustrato como a la punta del sensor (**Fig. 1-13**). A diferencia del método de imagen (ver **Sección 8.1.1**), en el que el anclaje de la muestra a la superficie suele ser por simple **fisisorción**, en SMFS se suele buscar que este anclaje sea más estable para asegurarnos que resista las fuerzas necesarias para el desplegamiento de la biomolécula. Por otra parte, las proteínas, al ser inmovilizadas en una superficie, tienden a desnaturizarse en cierta medida (Buijs *et al.* 1996). Por ello, es habitual utilizar técnicas de **funcionalización** de superficies para obtener anclajes direccionales y fuertes (idealmente covalentes) y para minimizar la superficie de interacción (Weisel *et al.* 2003). También es común el uso de métodos de anclaje específicos de las colas de purificación de la proteína recombinante, o colocar aminoácidos terminales capaces de establecer enlaces covalentes con determinadas superficies metálicas (como el grupo tiol de los residuos cisteína con el oro, (Rief *et al.* 1997)), e incluso utilizar agentes entrecruzantes (*crosslinking*) con el fin de reforzar estos anclajes para proteínas particularmente estables (Valbuena *et al.* 2009). Estas alternativas, sin embargo, introducen variables al sistema y posibles interferencias de efectos no siempre inocuos ni controlables, por lo que se sigue usando la fisisorción con bastante frecuencia.

1.3.2.1.2 Modalidades de espectroscopía de fuerzas

En un experimento de SMFS típico, la punta de la micropalanca se acerca hasta entrar en contacto con el sustrato, permitiéndole adsorber algunas moléculas. Si tenemos fortuna, una biomolécula individual puede encontrarse atrapada entre el sensor de fuerza (una micropalanca con una punta fina generalmente de Si₃N₄) y el sustrato (generalmente vidrio recubierto de oro o funcionalizado de algún otro modo), montado en un posicionador piezoeléctrico de alta precisión que permite el control de su posición, de modo que se logra establecer un "**circuito mecánico**" entre ambos elementos (**Fig. 1-13**). En el modo estándar de SMFS, el de **longitud constante** (*length-clamp*), el posicionador se retrae a velocidad constante (típicamente alrededor de 0,5 nm·ms⁻¹) hasta una distancia fijada mientras la micropalanca reporta las fuerzas que se oponen a la extensión de cualquier material que se hubiera quedado atrapado entre la punta de la micropalanca y el sustrato. Es habitual que durante estos estiramientos al azar se enganche una molécula de manera que a medida que estiramos llegue a ser el único elemento que conecte la punta con el sustrato, de tal forma que nos permita estudiar su resistencia al estiramiento en condición de molécula individual. En este modo de SMFS los registros obtenidos son **espectros fuerza-extensión** (**Fig. 1-14**), en los que se representa la fuerza medida por la micropalanca (con sensibilidad de pN) frente a la extensión recorrida por el piezoeléctrico (con resolución sub-nanométrica).

Los datos obtenidos se interpretan generalmente por medio de un modelo basado en la **teoría del estado de transición** TS (Bell 1978; Evans y Ritchie 1997). En este modelo, los dos estados (nativo y desplegado) se encuentran separados por una **barrera energética** (**Fig. 1-15**), cuya altura relativa disminuye por la fuerza aplicada como se describe en la siguiente ecuación de velocidad de reacción:

$$\text{Ec. 1-4} \quad k_U(F) = A \exp [- (\Delta G^\ddagger - F \Delta x_U) / k_B T],$$

donde $k_U(F)$ es la **tasa de desplegamiento** a una fuerza F dada, A es el denominado factor pre-exponencial, ΔG^\ddagger es la altura de la barrera energética entre el estado nativo y el TS, Δx_U la distancia al TS (anchura de la barrera de la energía de activación: distancia en las coordenadas de reacción sobre la que debe aplicarse la fuerza para alcanzar el TS), y $k_B T$ es la energía térmica. A partir de esta ecuación, es evidente que la fuerza aplicada directamente reduce la altura de la barrera de energética, facilitando así el desplegamiento de la proteína.

Además, de acuerdo con este modelo, la fuerza más probable de desplegamiento de una proteína, F_U , se puede predecir como:

$$\text{Ec. 1-5} \quad F_U = (k_B T / \Delta x_U) \ln (r \Delta x_U / k_U^0 k_B T)$$

donde k_U^0 es la **tasa de desplegamiento extrapolada a fuerza 0** y r es la **tasa de carga** que indica la tasa de cambio temporal de fuerza empleada durante el estiramiento de la proteína, que se define como el producto de v (velocidad de estiramiento) y k (constante elástica). Esto implica que la F_U media depende del logaritmo de la velocidad de tracción (**Fig. 1-15 y Sección 8.1.2**).

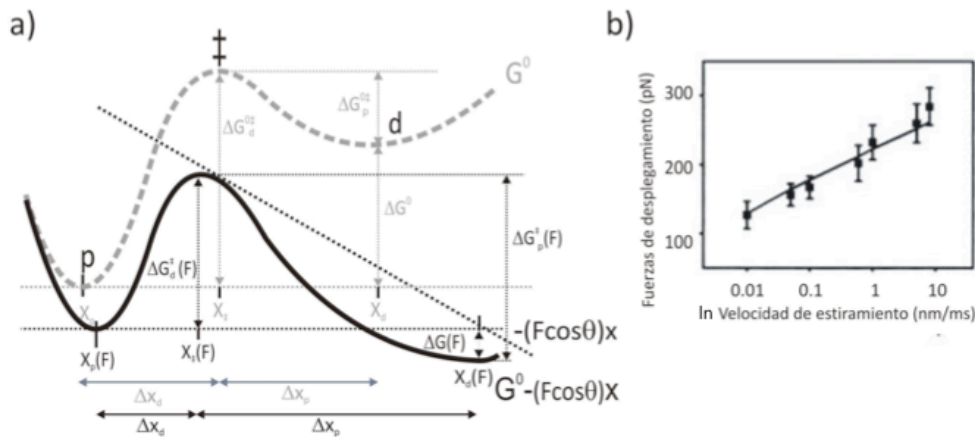


Figura 1-15. Parámetros cinéticos del desplegamiento mecánico. **a)** El efecto de la fuerza en el diagrama de energía libre de una proteína que se despliega siguiendo un modelo de dos estados (p plegado, d desplegado). La curva discontinua gris representa el proceso en ausencia de fuerza. La aplicación de una fuerza (recta discontinua negra) inclina el diagrama energético, disminuyendo la barrera al TS, representado por \ddagger ($[\Delta G^\ddagger(F) < \Delta G^{0\ddagger}]$, curva continua negra), lo cual aumenta la tasa de reacción de desplegamiento. La aplicación de una fuerza también disminuye la energía del estado desplegado d comparada con el estado plegado p ($[\Delta G(F) < 0]$), lo que supone un aumento de la población en el estado d . La coordenada de reacción mecánica es x , y ϑ marca el ángulo respecto de esa coordenada al que se aplica la fuerza. Con fuerza, las posiciones de los mínimos de energía libre (x_p y x_d) y el máximo (x^\ddagger) se modifican de tal manera que Δx_d se hace más corta (Δx_d negro $<$ Δx_d gris) y Δx_p más larga (Δx_p negro $>$ Δx_p gris). Estos cambios en las distancias son debidas a la curvatura del diagrama energético por efecto de la aplicación de la fuerza. **b)** Efecto de la velocidad de estiramiento sobre la F_U de una proteína (en este caso se trata del módulo I27 de titina). La F_U aumenta con la velocidad de estiramiento, indicando que el desplegamiento mecánico es un proceso cinético (Carrión-Vázquez *et al.* 1999).

Dado que los experimentos de SMFS se basan en **ensayo y error** (la punta es presionada repetidas veces contra la muestra depositada sobre la superficie y el éxito de los enganches depende en gran medida del azar), gran parte de los espectros obtenidos presentan “ruido” en la zona próxima a la superficie debido a interacciones inespecíficas indeseadas (**Fig. 1-16**). La estrategia habitual seguida en el campo es la utilización de proteínas con estructuras repetidas;

inicialmente se analizaron **proteínas naturalmente modulares**, y después mediante técnicas de cDNA se sintetizaron las denominadas **poliproteínas**, repeticiones en tándem de una proteína o módulo de interés (Rief *et al.* 1997; Carrión-Vázquez *et al.* 2006), de manera que la presencia de patrones repetidos de eventos de desplegamiento nos permite identificar sin ambigüedades los datos provenientes del desplegamiento de moléculas individuales. En los espectros fuerza-extensión obtenidos mediante el modo *length-clamp* de SMFS, las proteínas modulares o construidas por repeticiones presentan un patrón de desplegamiento característico en “**dientes de sierra**” (Figs. 1-14b,c y 1-16), en el que cada uno de esos “**dientes**” representa el desplegamiento de cada módulo individual. La altura de esos picos representa la fuerza que hay que ejercer para desplegar el módulo (F_u , fuerza de desplegamiento), y la distancia entre picos el tamaño en nm del módulo desplegado, siempre y cuando la región de resistencia esté en los extremos; incremento de la longitud de contorno de la molécula, ΔL_c , tras su ajuste a la ecuación del modelo de la “**cadena gusaniforme**” (worm-like chain, WLC, Fig. 1-17c) que describe la elasticidad de polímeros (Marko y Siggia 1995; Bustamante *et al.* 2004).

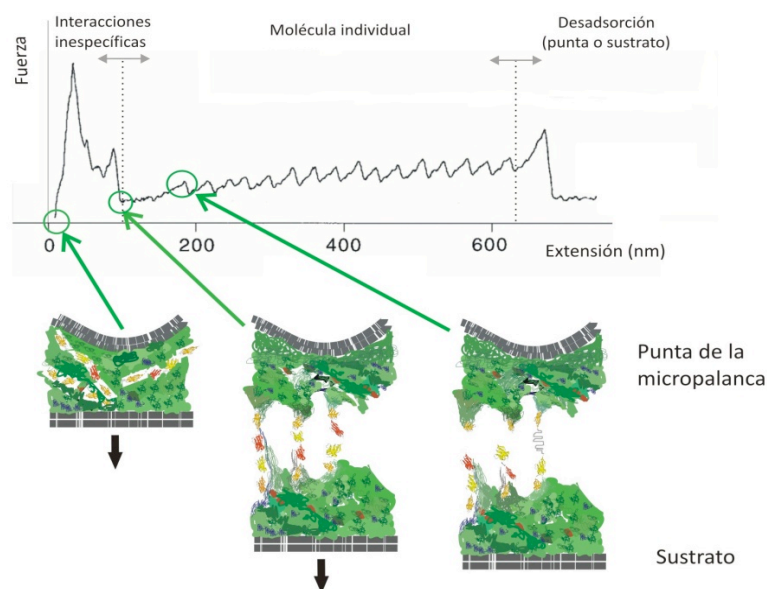


Figura 1-16. Representación de eventos relacionados con un espectro fuerza-extensión típico. La conexión punta-superficie puede eventualmente estar formada por una única proteína modular, lo que nos permitirá analizar su comportamiento mecánico al nivel de molécula individual. Nótese que la parte proximal de los espectros fuerza-extensión es típicamente ruidosa, debido a interacciones inespecíficas entre la punta y la muestra y/o múltiples moléculas en paralelo.

Existe otro modo de SMFS en el que estiramos a **fuerza controlada** (*force-clamp*) o a **fuerza incrementada de forma constante** (*force-ramp*, (Oberhauser *et al.* 2001)). En el modo de *force-clamp*, obtenemos espectros extensión-tiempo, en el que una proteína modular muestra un **patrón de desplegamiento “en escalera”**, siendo la altura de los “**escalones**” la correspondiente al tamaño del módulo desplegado a ese nivel de tensión. Por otro lado, en *force-ramp* obtenemos también **espectros fuerza-tiempo**, en los que cada evento de desplegamiento se muestra como un pico invertido. Estos picos representan la pérdida de tensión en la molécula con cada desplegamiento de un módulo y su duración refleja el tiempo que precisa el piezoeléctrico para corregir su posición para llegar al valor de fuerza fijada correspondiente. Esto se consigue mediante un mecanismo de *feedback* constante ejercido sobre el piezoeléctrico, por lo que la rapidez de ese *feedback* es crítica para el éxito de estos experimentos (en nuestro AFM, el tiempo de respuesta es aproximadamente 0,5 ms). Por otra parte, los modos en los que se controla la fuerza ofrecen la ventaja de que muestran **de manera**

directa la dependencia de la fuerza con la velocidad de estiramiento, por lo que podemos extraer directamente los **parámetros cinéticos** del desplegamiento con el fin de obtener información del **paisaje energético** de una proteína (ver **Sección 8.1.1.3**).

1.3.2.2. Nanomecánica de proteínas: determinantes de estabilidad mecánica y uso de poliproteínas

Cuando estiramos una proteína modular o una poliproteína mediante SMFS, la primera fuente de resistencia a la extensión que ofrece la molécula proviene de las **fuerzas entrópicas**. Estas fuerzas resultan de la tendencia de un polímero a formar un ovillo para maximizar su libertad conformacional (entropía) bajo el influjo de las **fluctuaciones térmicas**, la cual se reduce con el estiramiento. Esta **elasticidad entrópica** sigue una relación no lineal que se puede describir formalmente por el **modelo WLC** (**Fig. 1-17c**). Este modelo predice la fuerza de resistencia entrópica, F , del polipéptido a cualquier extensión a partir de dos parámetros descriptivos: L_c , la **longitud de contorno** (longitud total del polipéptido desplegado a fuerza infinita), y p , la **longitud de persistencia** (longitud máxima a lo largo de la cual la dirección del polímero permanece correlacionada). p representa el mínimo componente rígido de la cadena; en una proteína desnaturalizada o sin plegamiento correspondería con el valor de **0,4 nm**, longitud que corresponde aproximadamente con la longitud de un residuo aminoácido en una proteína estirada (Ainavarapu *et al.* 2007). Una vez que las interacciones implicadas en la resistencia mecánica global del plegamiento de la proteína (región conocida como "**broche mecánico**") se rompen, la proteína generalmente se despliega por completo. El tipo de plegamiento, así como el tipo de estructura secundaria, mantenida por interacciones locales, que contiene la proteína determinarán en gran medida el tipo de resistencia que la proteína ofrecerá a su estiramiento. Se ha observado una menor estabilidad mecánica en proteínas con gran contenido **α -hélice** en su estructura, mientras que las proteínas mecánicamente más estables contienen normalmente **hebras β** conectando los extremos N- y C-terminales en una **configuración "en cizalla"**, donde los enlaces de hidrógeno se disponen ortogonalmente respecto la fuerza aplicada (Carrión-Vázquez *et al.* 2006).

Si continuamos la extensión de una proteína modular (**Fig. 1-17b**), provocaremos el desplegamiento de cada uno de sus módulos, generalmente en una transición todo o nada que podemos describir mediante un modelo de dos estados (**Fig. 1-17a**), aunque existen excepciones a esta generalidad (Marszalek *et al.* 1999; Oroz *et al.* 2011). La **longitud de la proteína oculta a la fuerza** (ΔL_c) se libera y se puede medir a partir de la distancia entre los dos picos consecutivos, ajustándola al WLC (**Fig. 1-17c**). Este parámetro es característico de cada proteína que presente una estructura definida (**nativamente plegada**), depende del plegamiento, y es importante para identificar la molécula en estudio (usándose como una especie de "**huella digital**" molecular). Una extensión adicional repetirá este proceso para cada módulo plegado de manera secuencial, dando lugar a los "dientes de sierra" en los espectros fuerza-extensión (**Fig. 1-16**), o a las "escaleras" y "rampas" en los espectros extensión-tiempo. En estos experimentos los módulos son desplegados de manera ordenada de acuerdo a su estabilidad mecánica, por lo que los menos estables se despliegan antes. El **último pico** observable en los registros corresponde generalmente al desanclaje de la proteína bajo estudio de la punta o del sustrato y marca el final del experimento (**Fig. 1-16**).

Las proteínas tienden a desnaturalizarse total o parcialmente cuando se adsorben en una superficie, por lo que proteínas largas compuestas por módulos o poliproteínas poseen una ventaja adicional ya que tienen la posibilidad estadística de “sacrificar” parte de sus módulos o repeticiones al anclarse. Además, como la parte inicial (proximal al sustrato) de los espectros fuerza-extensión o extensión-tiempo suele estar contaminada por **interacciones inespecíficas** (Fig. 1-16), una proteína modular mostrará eventos de desplegamiento alejados de esta zona proximal. Por tanto, los estudios iniciales del campo se centraron en **proteínas multimodulares** con funciones mecánicas como **titina**, **tenascina**, **espectrina** y **fibronectina** (Rief *et al.* 1997; Oberhauser *et al.* 1998; Rief *et al.* 1999; Oberhauser *et al.* 2002). Sin embargo, las proteínas modulares presentan una población heterogénea de módulos, lo que dificulta identificar qué pico corresponde a un determinado módulo en un registro de SMFS.

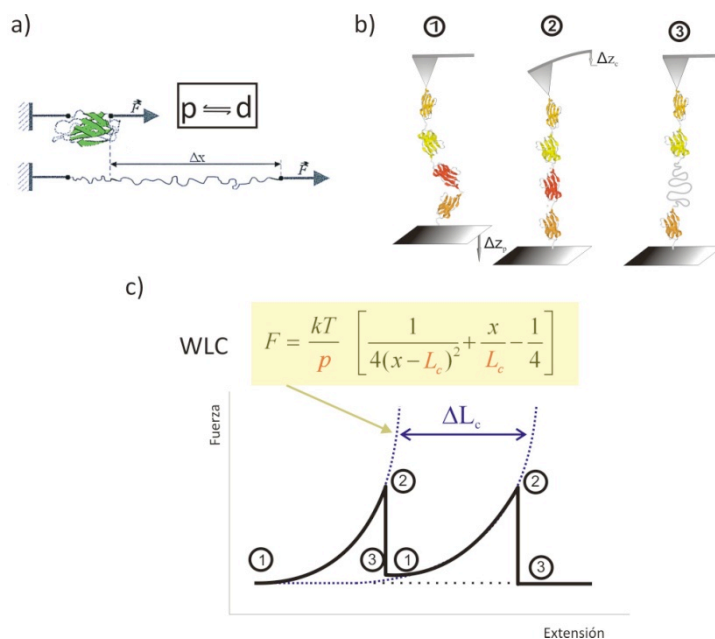


Figura 1-17. Desplegamiento mecánico de una proteína modular. **a)** El estiramiento de una proteína puede modelizarse como un sistema cinético de dos estados (plegado-desplegado). Bajo la influencia de una fuerza aplicada, el módulo es desplegado causando un aumento en su longitud, Δx . **b)** Estiramiento de una proteína modular. La extensión del piezoeléctrico (Δz_p) causa el estiramiento de la molécula, que resiste a su estiramiento debido a su elasticidad entrópica, lo que causa una curvatura en la punta de la micropalanca (Δz_c , estados 1 y 2). Cuando el módulo de menor estabilidad es desplegado, la L_c de la

proteína aumenta, relajando la fuerza en la punta hasta casi cero (estado 3). **c)** La elasticidad entrópica de las proteínas puede describirse por el modelo WLC de elasticidad de polímeros. Los dos parámetros ajustables, p y ΔL_c , pueden estimarse al ajustar los espectros fuerza-extensión a este modelo (líneas azules punteadas). Los números se corresponden con los sucesos detallados en **b**.

El desarrollo de métodos de síntesis de **poliproteínas (homoméricas y heteroméricas)** permitió el **análisis nanomecánico** tanto de **módulos individuales** de una proteína como de **proteínas no modulares** ya que se utiliza su periodicidad como marcador de molécula individual (Carrión-Vázquez *et al.* 1999; Carrión-Vázquez *et al.* 2006). Su síntesis se basa bien en **ingeniería genética**, donde mediante técnicas de DNA recombinante se genera un clon de cDNA en un vector de expresión que contiene la secuencia codificante para la expresión de repeticiones en tándem del módulo o proteína de interés (Carrión-Vázquez *et al.* 1999; Steward *et al.* 2002), o en técnicas de **bioquímica de proteínas**, donde mediante oxidación inducida se generan **enlaces disulfuro** entre residuos de cisteína de monómeros de la proteína bajo estudio (Yang *et al.* 2000).

2. Objetivos

2. Objetivos

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el análisis nanomecánico mediante SMFS de proteínas neurotóxicas representativas implicadas en patologías humanas, en concreto en enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas. Para complementar este análisis se realizarán estudios adicionales usando diferentes tipos de técnicas estructurales, espectrofotométricas y de imagen, así como bioquímicas, que en conjunto nos permitirán derivar conclusiones que ayuden a la propuesta de modelos mecanísticos para tratar de ahondar en la comprensión a nivel molecular en este grupo de trastornos. A continuación se detallan los objetivos concretos de la tesis:

Objetivo 1 – Desarrollo de un sistema de análisis de nanomecánica de proteínas versátil, diseñado especialmente para la **identificación inequívoca de moléculas de proteína** con baja estabilidad mecánica o con polimorfismo conformacional (pFS-2).

Objetivo 2 – **Clonaje y expresión de proteínas neurotóxicas** de fusión para el análisis nanomecánico mediante SMFS y para su caracterización estructural/amiloidogénica.

Objetivo 3 – Testado tanto de la **integridad estructural de la proteína portadora** como del **comportamiento amiloidogénico/ganancia en estructura β** de las proteínas neurotóxicas insertadas en la proteína portadora.

Objetivo 4 – **Análisis nanomecánico mediante SMFS de proteínas neurotóxicas** ($A\beta_{42}$, α -syn, polyQs y Sup35NM) directamente relacionadas con el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas más representativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades causadas por expansión del triplete CAG y enfermedades priónicas, respectivamente).

Objetivo 5 – Diseño y análisis de controles adicionales que indiquen que se está estudiando **interacciones intramoleculares de moléculas individuales** y no interacciones intermoleculares o eventos de desanclaje del sustrato o punta: el péptido SV111 y el doble mutante F19S/L34P $A\beta_{42}$.

Objetivo 7 – Análisis nanomecánico mediante SMFS de **formas familiares de enfermedad** (Arctic -E22G- $A\beta_{42}$, A53T y A30P α -syn y Q₆₂).

Objetivo 8 – **Efecto del péptido inhibidor QBP1** en la nanomecánica de las proteínas neurotóxicas analizadas.

Objetivo 9 – Generación de un **protocolo general**, simple y rápido, basado en el vector pFS-2, para el análisis nanomecánico **general e inequívoco** de proteínas IDPs, y en particular de proteínas neurotóxicas amiloidogénicas.

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

Clonaje molecular

La α -syn humana (residuos 1-140, código UniProtKB / Swiss-Prot P37840) se clonó mediante PCR utilizando como molde una biblioteca completa de cDNA de cerebro humano (*Clontech*). El péptido A β 42 humano (código UniProtKB / Swiss-Prot P05067) se clonó mediante PCR usando como molde el clon pcDNA3-APP amablemente cedido por el Profesor Fernando Valdivieso. La proteína priónica de *Saccharomyces cerevisiae* Sup35NM (región NM, residuos 1-253, UniProtKB/código Swiss-Prot P05453) se clonó por PCR utilizando como molde el plásmido pJCSUP35 (*Addgene*), que contiene la secuencia completa de Sup35. Las diferentes longitudes analizadas de polyQ se clonaron por PCR utilizando como molde plásmidos que contienen secuencias codificantes para Q₁₉, Q₃₅ y Q₆₂, amablemente cedidos por el Dr. Yoshitaka Nagai (Nagai *et al.* 2000). La región citoplasmática (residuos 1-94) de la proteína VAMP2 de *Rattus norvegicus* (código UniProtKB / Swiss-Prot P63045) se clonó mediante PCR usando como molde el clon pGEX-KGVAMP2 (Calakos *et al.* 1994), que contiene la secuencia de cDNA completa de VAMP2, amablemente cedido por el Profesor Richard Scheller.

Todas las secuencias fueron clonadas en primer lugar en el vector pCR2.1 (*Invitrogen*) o pT7Blue (*Novagen*) y después de verificar que la secuencia era correcta, se utilizó, cuando procedía, el kit QuickChange (*Stratagene*) para realizar mutagénesis dirigida tanto en α -syn (generando los mutantes A30P y A53T), como en A β 42 (generando el mutante Arctic -E22G- y el doble mutante F19S/L34P). Finalmente, todas las secuencias fueron clonadas en el vector pFS-2 (para su análisis de SMFS) utilizando los sitios de restricción AgeI-SmaI de el sitio de clonaje múltiple (MCS, del inglés *Multi-Cloning Site*) del módulo portador (Oroz *et al.* 2012). La proteína portadora utilizada fue ubicuitina (que será referida como ubi a lo largo del texto) para α -syn (silvestre -wt- y mutantes), el módulo I27 de titina cardaca humana para los diferentes tractos de polyQ, A β 42 (wt y mutantes) y la proteína priónica Sup35NM y se usaron ambos portadores para una IDP no amiloidogénica como control negativo, la región citoplásmica de VAMP2.

El diseño de ubi como módulo portador se detalla ampliamente en Oroz *et al.* 2012. Tomando como base un vector con repeticiones de ubi (vector pFS-1), se insertó un MCS en un módulo de ubi. Para prevenir una posible alteración del plegamiento del módulo, estudiamos los bucles (*loops*) naturales de esta estructura con el fin de seleccionar los más adecuados para llevar a cabo esta inserción. Basándonos en trabajos previos donde se analiza el efecto de inserciones (en diferentes bucles del módulo de ubi) de diferente número de aminoácidos sobre su estabilidad termodinámica (Ferraro *et al.* 2005; Ferraro *et al.* 2006; Ferraro y Robertson 2008), se seleccionó el bucle formado por los aminoácidos 9-10 ya que era el que mostraba mayor tolerancia en términos de plegamiento global, estabilidad y pérdida de enlaces de hidrógeno. Para insertar el MCS, se seleccionó el módulo ubi presente en posición 4 del pFS-1. Las enzimas de restricción empleadas fueron AgeI, BsiWI, MluI y SmaI, que codifican para los residuos aminoácidos TG, RS, TR y PG, respectivamente. Dos residuos de glicina fueron insertados en cada extremo del MCS (GGTGGA y GGAGGA) para hacer la inserción más flexible y tratar de minimizar posibles efectos sobre el plegamiento del módulo de ubi. Además, una secuencia espaciadora (TCATCA) fue insertada entre los sitios de corte de las enzimas de restricción para aumentar la eficiencia de digestión enzimática en el MCS. De esta forma, y utilizando los sitios AgeI/SmaI mencionados anteriormente, las secuencias GGTG y PGTRGG, que

proceden de la secuencia del MCS junto con las dos G añadidas, se encontraban flanqueando cada lado de las proteínas insertadas en la ubi que actúa como portadora (α -syn wt y mutantes y VAMP2). Como primer control para ver la tolerancia de ubi a ser usada como portadora, se insertó un módulo de I27 ya que se conocen muy bien sus propiedades mecánicas, al tratarse de un módulo de referencia en nanomecánica de proteínas. Para el clonaje dentro del MCS del módulo de I27 (pFS-2 + I27), se seleccionaron los sitios de corte BsiWI y MluI. De esta manera se mantienen las secuencias de aminoácidos GGTGRS y TRPGGG pertenecientes al MCS en cada extremo del módulo I27. Como molde para la amplificación por PCR de la secuencia del I27 se empleó un plásmido que contiene 12 repeticiones de I27 (Carrión-Vázquez *et al.* 1999).

El módulo portador I27 se generó mediante mutagénesis dirigida usando como molde la secuencia de cDNA del módulo I27, en el que se insertaron sitios de restricción para AgeI y SmaI (a modo de MCS corto) entre los residuos A42 y A43 del bucle CD, que había demostrado ser un bucle tolerante a inserciones (H. Li & Fernández JM, **comunicación personal**). Este MCS fue usado posteriormente para introducir las proteínas huéspedes. Para generar la proteína I27 + MCS (sin huésped en su interior, usada como control negativo), se eliminó la secuencia de nucleótidos CATC del I27 para mantener el marco de lectura abierto después de la inserción del MCS (I27-MCS Δ 4, **Tabla 1**). Esta delección no fue necesaria para mantener el marco de lectura abierto en las construcciones que presentaban una proteína huésped. Los pares de aminoácidos TG y PG se añadieron, precedentes de la secuencia del MCS, a cada lado de las proteínas insertadas en este módulo portador.

Con el fin de simplificar la caracterización biofísica y los experimentos control realizados, las medidas estructurales y de estabilidad térmica (NMR, CD y calorimetría diferencial de barrido -DSC-), así como los estudios de agregación/fibrillogénesis (turbidimetría, ensayo de unión de Rojo Congo, PAGEs no desnaturizantes, microscopía electrónica de transmisión -TEM- e imagen por AFM -iAFM-), se generaron **proteínas de fusión mínima** que consistían **sólo** en **el módulo portador** con la NP específica insertada (portador + huésped), sin las repeticiones marcadoras de la poliproteína pFS-2, utilizadas únicamente en los constructos para SMFS con el fin de ayudar a identificar moléculas individuales. Para llevar a cabo la comparación con las construcciones portador+NPs generadas, se generaron también **NPs aisladas** de manera recombinante para α -syn (wt y mutantes) y Sup35NM. Las proteínas individuales correspondientes a A β 42 y las diferentes polyQs no se produjeron debido a las dificultades inherentes al análisis y producción de estos pequeños péptidos.

Así pues, las proteínas generadas fueron:

1. ubi humana (código UniProtKB/Swiss-Prot P0CG47), ubi-MCS, α -syn, A30P α -syn, A53T α -syn, ubi + α -syn, ubi + A30P α -syn, ubi + A53T α -syn y ubi + VAMP2. Todas ellas fueron clonadas en el vector pET28a (Novagen) utilizando NheI y SalI como sitios de restricción.
2. I27 humano (código UniProtKB / Swiss-Prot Q8WZ42), I27-MCS Δ 4, I27 + A β 42, I27 + Arc A β 42, I27 + F19S/L34P A β 42, I27 + Q₁₉, I27 + Q₃₅, I27 + Q₆₂, Sup35NM, I27 + Sup35NM, VAMP2 e I27 + VAMP2, se clonaron en el vector pET28a (Novagen) utilizando NheI y XhoI como sitios de restricción.

Usando esta estrategia de clonaje en el vector pET28a, la secuencia de aminoácidos MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAS se mantuvo en el N-terminal de las proteínas generadas. Dos codones de parada se introdujeron justo antes del sitio de restricción situado en el extremo 3'

de la región codificante de todas las secuencias clonadas. Tanto en pFS-2 como en pET28a, las diferentes longitudes de polyQs usadas (Q₁₉, Q₃₅, Q₆₂) fueron flanqueadas por las secuencias MVSTHHHHH y HHGNSGPP en sus extremos N y C-terminal, respectivamente. Dichas secuencias provenían de los plásmidos originales usados como molde (Nagai *et al.* 2000).

Para construir la secuencia de DNA codificante para las proteínas (I27)₄-Q_{20/36/51}-(I27)₃, se utilizaron oligonucleótidos bicatenarios fosforilados en 5' que contenían codones (CAG o CAA) para diferente número de Qs. El oligonucleótido que contiene Q₂₀ se clonó directamente usando los sitios de restricción NheI/XbaI del vector pAFM para producir la secuencia codificante de (I27)₄-Q₂₀-(I27)₃. Este vector, amablemente cedido por la Profesora Jane Clarke, que consiste en el vector pRSETA -*Invitrogen*- con ocho copias del módulo I27 (Steward *et al.* 2002). Los clones (I27)₄-Q_{36/51}-(I27)₃ fueron construidos de manera indirecta. Para ello, en primer lugar fue clonado un oligonucleótido dúplex que codifica para Q₃₀ en el vector pRSETA usando como sitios de restricción NheI/PvuII. PvuII dejó un extremo romo terminado en la secuencia CAG, que permitió la unión de las restantes Q₆ y Q₂₁ en un segundo paso de clonaje vía PvuII/XbaI. Finalmente, el fragmento completo que contenía Q₃₆ y Q₅₁ fue clonado en el vector pAFM vía NheI/XbaI. Con el fin de mejorar la solubilidad de las proteínas de fusión, los oligonucleótidos que contenían las regiones codificantes para las diferentes longitudes de polyQs fueron flanqueadas por dos residuos de lisina (Venkatraman *et al.* 2004).

Las cepas DH5 α (*Invitrogen*) y XL1 Blue (*Stratagene*) de *Escherichia coli* se utilizaron para todas las etapas de clonación/mutagénesis. Los oligonucleótidos utilizados para todos los procedimientos de clonación se resumen en la **Tabla 1**. Todas las secuencias se verificaron por secuenciación de ambas cadenas del DNA.

| Nombre (Mut: mutagénico) | Secuencia 5→3 |
|---|---|
| I27-MCS 5' (Mut) | GAAAGGACAGCCTTTGGCA ACCGGTTTCATCCCGGG GCTTCCCTGACTGTGAAATC |
| I27-MCS 3' (Mut) | GATTTACAGTCAGGGGAAG CCCCGGGATGAACCGGT GCCAAAGGCTGTCCTTTC |
| pFS-2+ α -syn 5' | ACCGGT ATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGC |
| pFS-2+ α -syn 3' | CCCGGGG GCTTCAGGTTTCGTAGTCTTGATACCTTCC |
| A30P α -syn 5' (Mut) | GGTGTGGCAGAAGCA CCAGG AAAGACAAAAGAGG |
| A30P α -syn 3' (Mut) | CCTCTTTTGTCTTTCCT GGT GCTTCTGCCACACC |
| A53T α -syn 5' (Mut) | GTGGTGCATGGTGTG ACA ACAGTGGCTGAGAAG |
| A53T α -syn 3' (Mut) | CTTCTCAGCCACTGTT TGT CACACCATGCACCAC |
| ubi+ α -syn, ubi+A30P α -syn, ubi+A53T α -syn 5' | GAATTCGGCTTGCTAGCATGCAAATC |
| ubi+ α -syn, ubi+A30P α -syn, ubi+A53T α -syn 3' | GAATTCGGCTTG TCG ACTCATCACCCACCTCTGAGAC |
| α -syn, A30P α -syn, A53T α -syn 5' | GCTAG CATGGATGTATTCATGAAAGG |
| α -syn, A30P α -syn, A53T α -syn 3' | GTCG ACTCATCAGCTTCAGGTTTCGTAGTCTTG |
| pFS-2+Q _n 5' | ATC ACCGGT ATGGTTTCCACCCATCACCATCACCACCAGCAAC |
| pFS-2+Q _n 3' | TAT CCCGGG CGGCGGACCAGAGTTACCGTGATGCTGCTGC |
| pFS-2+VAMP2 5' | CCAA ACCGGT ATGTCGGCTACCGCTGCCACCG |
| pFS-2+VAMP2 3' | T CCCCCGGG CTTGAGGTTTTTCCACCAAG |
| pFS-2+Sup35NM 5' | ACCGGT ATGTCGGATTCAAACCAAGGC |
| pFS-2+Sup35NM 3' | CCCGGG ATCGTTAACAACCTTCGTCATCC |

| | |
|---|---|
| pFS-2+A β 42 5' | ACCGGTGATGCAGAATTCCGACATGACTCAGG |
| pFS-2+A β 42 3' | CCCGGGCGCTATGACAACACCGCCACC |
| Arc A β 42 5' (Mut) | GGTGTCTTTGCA GG AGATGTGGGTTCAAACAAAGG |
| Arc A β 42 3' (Mut) | CCTTTGTTTGAACCCACATC TCCT GCAAAGAACACC |
| F19S A β 42 5' (Mut) | CATCATCAAAAATTGGTGT CCTT GCAGAAGATGTGGG |
| F19S A β 42 3' (Mut) | CCCACATCTTCTGCAAAG G ACACCAATTTTGTATGATG |
| L34P A β 42 5' (Mut) | GGTGCAATCATTGGACCCATGGT G GCGGTGTTGTC |
| L34P A β 42 3' (Mut) | GACAACACCGCC CC ACCATGGGTCCAATGATTGCACC |
| I27-MCS (Δ 4) 5' (Mut) | GGACAGCCTTTGGCAACCGGT(Δ4)CCCGGGGCTTCCCC |
| I27-MCS (Δ 4) 3' (Mut) | GGGGAAGCCCCGGG(Δ4)ACCGGTTGCCAAAGGCTGTCC |
| VAMP2 5' | CTAGCTAGCATGTCTGGCTACCGTGCCACCG |
| VAMP2 3' | CCG <i>CTCGAGCTACTA</i> CTTGAGGTTTTTCCACCAG |
| Sup35NM 5' | CTAGCTAGCATGTCTGGATTCAAACCAAGGC |
| Sup35NM 3' | CCGCTCGAG CTAATAATCGTTAAACAACCTTCGTCATCC |
| I27-MCS (Δ 4), I27+Q _n , I27+ A β 42, I27+Arc A β 42, I27+VAMP2, I27+ F19S/L34P A β 42, I27+Sup35NM 5' | CTAGCTAGC CTAATAGAAGTGAGAGAAGCCTC |
| I27-MCS (Δ 4), I27+Q _n , I27+ A β 42, I27+Arc A β 42, I27+VAMP2, I27+ F19S/L34P A β 42, I27+Sup35NM 3' | CCGCTCGAG CTAATAAATCTTTCACTTTCAGATTGGC |
| Q ₂₀ 5' | CTAGCAAGAAACAGCAACAACAGCAGCAGCAACAGCAACAACAGCAACAG CAGCAACAACAGCAGAAGAAAT |
| Q ₂₀ 3' | CTAGATTTCTTCTGCTGTTGTTGTTGCTGCTGTTGCTGTTGTTGCTGTTGCTG CTGCTGTTGTTGCTGTTTCTTG |
| Q ₃₀ 5' | CTAGCAAGAAACAGCAACAACAGCAGCAGCAACAGCAACAACAGCAACAG CAGCAACAACAGCAGCAGCAACAACAGCAGCAGCAACAGCAACAGAA AT |
| Q ₃₀ 3' | CTAGATTTCTTCTGTTGCTGTTGCTGCTGCTGTTGTTGCTGCTGTTGTTGTTG CTGCTGTTGCTGTTGTTGTTGCTGTTGCTGCTGTTGTTGCTGTTTCTTG |
| Q ₃₀ 5' | CTAGCAAGAAACAGCAACAACAGCAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAG CAACAGCAGCAACAACAGCAACAGCAACAACAGCAACAGCAACAG |
| Q ₃₀ 3' | CTGTTGCTGTTGCTGTTGTTGTTGCTGTTGTTGCTGTTGTTGCTGTTGCTGCTGCT GTTGTTGTTGCTGTTGCTGCTGTTGTTGCTGTTTCTTG |
| Q ₂₀ 5' | CAGCAACAGCAGCAACAACAGCAGCAACAGCAGCAACAACAGCAACAGCA ACAACAGCAGAAGAAATCTAGA |
| Q ₂₀ 3' | TCTAGATTTCTTCTGCTGTTGTTGCTGTTGCTGTTGTTGCTGTTGCTGCTGTT GTTGTTGCTGCTGTTGCTG |
| Q ₆ 5' | CAGCAACAGCAGCAACAGAAGAAATCTAGA |
| Q ₆ 3' | TCTAGATTTCTTCTGTTGCTGCTGTTGCTG |
| ubi-MCS 5' (Mut) | CGTGAAGAACTCACT GGTGGAAACCGGTCGTACGTC AGGCAAGACCATCACCT TG |
| ubi-MCS 1 3' (Mut) | CAAGGGTGATGGTCTTGCTC GACGTACGACCGGTTCCACC AGTGAGTGCTTCA CG |
| ubi-MCS 2 5' (Mut) | GAACCGGTCGTACGTC ATCACCCGGGACGCGTGGAGG AGGCAAGACCATCACCC |
| ubi-MCS 2 3' (Mut) | GGTGATGGTCTTGCTC CCTCCACGCGTCCCGGGTGAT GACGTACGACCGGTTCC |
| ubi + I27 5' | CGTACGCTAATAGAGGTGGAAAG |
| ubi + I27 3' | ACGCGTCAATTCTTTCACTTTCAGATTGG |

Tabla 1. Resumen de oligonucleótidos utilizados para el diseño del pFS-2 y para el clonaje de las diferentes proteínas huéspedes. Los sitios de restricción introducidos por PCR en las secuencias amplificadas se señalan en cursiva. Los oligonucleótidos mutagénicos se indican mediante (Mut) y las

mutaciones introducidas se señalan en cursiva y negrita. Las secuencias adicionales agregadas en de cada sitio de restricción se eligieron basándose en las recomendaciones de *New England Biolabs*, con el fin de mejorar la eficiencia de digestión de las secuencias lineales de ADN. Todos los oligonucleótidos utilizados fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich*.

Expresión y purificación de las proteínas analizadas

Las proteínas de fusión basadas en pFS-2 se expresaron en la cepa C41 (DE3) de *E. Coli* (Miroux y Walker 1996), mientras que las proteínas de fusión mínima (portador + huésped) y NPs/VAMP2 aisladas se expresaron en la cepa BL21 (DE3) (*Invitrogen*) o C41 (DE3). Las proteínas (I27)₄-Q_{20/36/51}-(I27)₃ se expresaron en la cepa BLR (DE3)/pLysS (*Novagen*). pLysS fue usado para suprimir la expresión basal del promotor T7 mediante la producción de lisozima T7, un inhibidor natural de la RNA polimerasa del fago T7. Todos los cultivos se crecieron a 37°C hasta que se alcanzó una OD_{595nm} de 0,5 a 0,8, y la expresión se indujo durante 3 ó 4 horas mediante la adición de 1 mM IPTG.

Para el caso de α -syn (wt y mutantes), las células bacterianas fueron lisadas siguiendo un protocolo establecido, con 1 mg/ml de lisozima y 1% de Triton X-100 (Sambrook 1989). Para el resto de proteínas, el protocolo incluyó la adición de 0,5% del detergente Tween-20 y 10 pulsos de sonicación de 10s de duración cada uno de ellos a 4°C (con 10s de espera entre pulsos). Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺ utilizando columnas HisTrap HP (*GE Healthcare*) en un aparato FPLC (ÄKTA Purifier, *GE Healthcare*). El tampón usado fue 50mM de fosfato de sodio [pH 7,4]/500 mM NaCl + imidazol 50 ó 500 mM para su unión a la columna y elución de la misma, respectivamente. Después de este primer paso de purificación por afinidad, común para todas las proteínas, se hicieron etapas adicionales de purificación cuando se consideró necesario (como sigue):

Para la proteína pFS-2 + α -syn (wt y mutantes), las fracciones de proteína purificada mediante afinidad de Ni²⁺ se concentraron y dializaron en PBS [pH 7,4] mediante ultrafiltración utilizando filtros Amicon 10K (*Millipore*). Después de un breve pulso de sonicación, las muestras se purificaron de nuevo por cromatografía de afinidad utilizando columnas Streptrap HP (*GE Healthcare*) por FPLC, usando PBS [pH 7,4] y PBS / destiobiotina 2.5 mM [pH 7,4], como tampones de unión y elución, respectivamente. El Strep-tag presente en el C-terminal de la construcción pFS-2 se une a biotina, que se encuentra pegada a la columna. Para las proteínas pFS-2 + A β 42, pFS-2 + Arc A β 42, pFS-2 + F19S/L34P A β 42, pFS-2 + Sup35NM, pFS-2 + Q_{19/35/62} y pFS-2 + VAMP2, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular en 100 mM TrisHCl/1,25-1,5 M de cloruro de guanidinio (GdmCl) [pH 7,5]. Esta concentración de GdmCl no desnatura ubi o I27 (Carrión-Vázquez *et al.* 1999; Went *et al.* 2004), lo que nos permitió eliminar contaminantes presentes que co-elúan con nuestra proteína recombinante tras la purificación por afinidad. La columna de exclusión molecular usada fue una HiLoad 16/60 200 PG (*GE Healthcare*), y los procedimientos de purificación fueron similares para todas las proteínas. La pureza alcanzada para todas ellas fue aproximadamente de un 90%, estimado mediante electroforesis en SDS-PAGE (no mostrado). Finalmente, antes de realizar los experimentos de SMFS, las fracciones que contenían la proteína pura fueron de nuevo concentradas y dializadas en 10 mM Tris HCl/ 5 mM DTT [pH 7,5] o PBS [pH 7,4] por ultrafiltración, utilizando filtros Amicon 10K (*Millipore*), hasta alcanzar una concentración de 2 a

3 μM . En el caso de $(\text{I27})_4\text{-Q}_{20/36/51}\text{-(I27)}_3$, sólo se realizó una etapa de purificación de afinidad de Ni^{2+} , similar a la descrita anteriormente, y las proteínas se almacenaron entre 5 y 7 μM en PBS/0,2 mM EDTA/ 1 mM DTT [pH 7,4] para su posterior análisis mediante SMFS.

Para las proteínas sin marcador de poliproteína (portador + huésped o NPs/VAMP2 aisladas), se llevó a cabo un paso de cromatografía de exclusión molecular después de la purificación por cromatografía de afinidad de Ni^{2+} , utilizando como tampón 100 mM TrisHCl/1,25-1,5 M GdmCl [pH 7,5]. Todas estas proteínas presentaron una pureza superior al 90% cuando se analizaron por SDS-PAGE (no mostrado). La presencia de una única banda mediante PAGEs en condiciones no desnaturalizantes (Gallagher 2001), indicó la existencia de una única población en forma de monómero. Las fracciones purificadas se concentraron de nuevo por ultrafiltración usando filtros Amicon 3K (Millipore) y el tampón se intercambió al más apropiado para aplicaciones posteriores.

En todos los casos expuestos anteriormente (poliproteínas y proteínas sin marcador de poliproteína), la concentración de proteína fue determinada midiendo absorbancia a 280 nm, utilizando en cada caso el coeficiente de extinción molar y peso molecular teóricos.

AFM-SMFS: Sustratos usados, preparación de experimentos y análisis de datos

Sustratos usados

Para llevar a cabo los experimentos de SMFS se depositó una pequeña gota de la preparación de proteína (aproximadamente de 2 a 8 μl de una solución a 2 ó 3 μM) sobre una gota del tampón experimental correspondiente (10 mM Tris HCl/5 mM DTT [pH 7,5] o PBS [pH 7,4]), previamente depositada sobre el sustrato, que consistió en cubreobjetos recubiertos de oro o cubreobjetos funcionalizados con ácido nitrilotriacético (NTA)- Ni^{2+} . Se dejó adsorber entre 10 y 20 min. Ambos sustratos han sido utilizados en este trabajo obteniendo resultados idénticos.

Cubreobjetos recubiertos de oro

Las poliproteínas basadas en pAFM y en pFS-2 pueden anclarse de forma covalente a sustratos de vidrio recubiertos de oro (*Gold arrandee*TM) debido a dos residuos de cisteína en su extremo C-terminal que forman, al reaccionar, un enlace covalente S-Au (Steward *et al.* 2002; Oroz *et al.* 2012).

Cubreobjetos funcionalizados con NTA- Ni^{2+}

Los cubreobjetos funcionalizados con NTA- Ni^{2+} también pueden ser utilizados para anclar las poliproteínas basadas en pFS-2 de manera covalente, debido a que presentan una cola de 6 residuos de His en su extremo N-terminal (Oroz *et al.* 2012). Para su preparación, los cubreobjetos se sumergieron o/n en primer lugar durante en una solución 20 N de KOH y luego se colocaron bajo un flujo de agua MilliQ durante 1 hora antes de que finalmente fuesen incubados en una solución 2% de 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS; *Sigma-Aldrich*)/0,02% CH_3COOH a 90°C durante 1 hora. Posteriormente, se lavaron con agua MilliQ durante 1 hora y posteriormente se incubaron 15 minutos en un horno a 120°C. Después de dejarlos enfriar a temperatura ambiente (RT) durante aproximadamente 10 min, los

cubreobjetos se transfirieron a una solución 100 mM DTT durante 15 min y después se lavaron con agua MilliQ durante 1 hora. A continuación, una gota de aproximadamente 50 μ l de una solución de 20 mg/ml de maleimida-C3-NTA (*Laboratorios Dojindo*) disuelta en 10 mM de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) [pH 7,0] se depositó sobre cada cubreobjetos durante 30 min. Después de lavar con agua MilliQ, una gota (60 μ l) de 10 mM NiCl₂ se añadió a cada cubreobjetos y se dejaron incubar durante 10 min. Por último, los cubreobjetos se lavaron brevemente en agua MilliQ antes de su almacenamiento para su uso a RT.

Preparación de experimentos de SMFS

Todos los datos se obtuvieron en una ventana de tiempo de 20-30 días tras la purificación de las proteínas. Las muestras se mantuvieron a 4°C entre sesiones de experimentos. Para realizar las medidas en presencia de los péptidos inhibidores QBP1 (Tomita *et al.* 2009) y SV111 (Arslan *et al.* 2010), las muestras de proteína fueron incubadas a 4°C con el péptido correspondiente durante la noche anterior. La IC₅₀ de QBP1 es de 3,6 μ M y su actividad inhibidora relativa a 20 μ M es 85,6% (usando una concentración de proteína de 7,5 μ M, (Tomita *et al.* 2009)). Las muestras de poliproteínas se usaron a unos 2 μ M (con una estequiometría inhibidor/proteína aproximadamente 4 veces mayor a la utilizada en Tomita *et al.* 2009. Para el péptido SV111 la IC₅₀ es 31,7 \pm 0,8 μ M, a una concentración de 25 μ M de A β 42 (Arslan *et al.* 2010). La relación estequiométrica inhibidor/proteína utilizada fue aproximadamente 30 veces mayor a la usada en Arslan *et al.* 2010.

El péptido QBP1-M8 (WKWWPGIF), acetilado en el grupo amino del N-terminal fue sintetizado en el servicio de proteómica del CBMSO/UAM-CSIC mediante síntesis química en fase sólida Fmoc. El análisis por HPLC reveló una pureza superior a 95,6%. El péptido SV111 (GDKAGAEVLA AVKAIKEK) se sintetizó por *GenScript EE.UU., Inc.* La identidad del se confirmó por espectrometría de masas y espectroscopía de NMR. Su pureza se determinó por HPLC, siendo aproximadamente de 95,3%.

Nuestro AFM, usado para llevar a cabo las medidas de SMFS con capacidad de obtener imágenes añadida, y su modo de funcionamiento se describió anteriormente en Valbuena *et al.* 2009 (ver **Sección 8.1.1.1.2**). Antes de cada experimento, la micropalanca se limpió durante 1 min con una lámpara UV (UV/Ozono ProCleaner™ Plus, *Bioforce Nanoscience Inc.*). La constante de muelle de cada micropalanca individual, generalmente compuestas de Si₃N₄ (MLCT-AUNM, *Grupo Veeco Metrology*, y Biolever, *Olympus*), se calculó usando el teorema de equipartición (Florin *et al.* 1995), con valores experimentales que van desde 35 hasta 70 pN/nm para las micropalancas de MLCT-AUNM y aproximadamente 30 pN/nm para las micropalancas Biolever. Al acercarse el posicionador piezoeléctrico a la muestra en el eje z las proteínas, depositadas sobre el sustrato, resultan ancladas por adsorción a la punta de la micropalanca. El piezoeléctrico era retraído varios cientos de nm para estirar las proteínas previamente adsorbidas. Todos los experimentos de SMFS se realizaron a una velocidad de estiramiento constante de 0,4 nm/ms en el denominado modo “length clamp” (ver **Sección 1.3.2.1.2**) y los datos obtenidos se analizaron utilizando el software **Igor Pro 6** (*Wavemetrics*). La elasticidad de las moléculas estiradas se analizó utilizando el modelo de elasticidad de polímeros WLC (Bustamante *et al.* 1994; Marko y Siggia 1995):

$$F_{WLC} = \frac{k_B T}{p} \left[\frac{1}{4(x - L_C)^2} + \frac{x}{L_C} - \frac{1}{4} \right],$$

donde F es la fuerza de desplegamiento, p es la longitud de persistencia, x corresponde a la longitud de extremo a extremo y L_c es la longitud de contorno de la proteína estirada. L_c y p son los dos parámetros ajustables de la ecuación (ver **Sección 1.3.2.2**).

Análisis de los datos de SMFS

Los criterios utilizados para la selección de registros *bona fide* que correspondían al estiramiento de una sola molécula, fueron bastante estrictos y se pueden resumir como sigue:

a) El fragmento del polipéptido desordenado (N2B) del vector pFS-2 actúa como un útil espaciador para alejarnos de la región “ruidosa” proximal de los espectros fuerza-extensión ya que supone entre 50 y 70 nm si la poliproteína ha sido estirada desde sus extremos. Por tanto, **rechazamos cualquier registro donde el/los pico/s de fuerza de la supuesta NP se encuentren en dicha problemática región** (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009).

b) El registro debe mostrar varios (idealmente **tres o más**) **picos de fuerza atribuibles al desplegamiento mecánico de repeticiones de ubi** utilizadas como marcadores de monomolecularidad en el vector pFS-2, cuyos valores de F_u y ΔL_c son característicos y fueron descritos en estudios previos Carrión-Vázquez *et al.* 2003.

c) La poliproteína **no debe mostrar más picos de fuerza de los esperados** a partir del diseño de la poliproteína pFS-2, excluyendo los derivados del desplegamiento de las NPs debido a la posible plasticidad conformacional.

d) **La longitud total de la molécula desplegada no puede ser mayor que la longitud teórica total del polipéptido extendido**, considerando un aumento en longitud de 0,4 nm por aminoácido desplegado (Ainavarapu *et al.* 2007).

e) Dado que la NP alojada dentro del módulo portador se encuentra “oculta a la fuerza” en la estrategia de la proteína portadora, **el pico de fuerza proveniente del desplegamiento del módulo portador debe preceder siempre al/los pico/s de fuerza correspondiente/s al desplegamiento de la NP** insertada en su interior.

f) Los picos de fuerza correspondientes al desplegamiento completo del módulo portador con **una extensión más corta de la esperada** (26 y 29,5 nm para la ubi y el I27, respectivamente) **se excluyen de nuestro análisis** ya que, en principio, puede tener su origen en interacciones indeseadas entre la NP insertada y el módulo portador.

g) En nuestro análisis **sólo se incluyeron los datos de fuerza que mostraron un ΔL_c que, al sumarse, coincidía exactamente con el ΔL_c teórico de la NP completa** (con un margen de tolerancia de ± 1 nm). En el caso de **eventos donde la NP no generaba ningún pico de fuerza, el rango de tolerancia considerado fue menos riguroso (± 2 nm)**, ya que estos eventos son más sencillos de identificar. Para obtener aproximadamente las 100 moléculas incluidas en el análisis (por proteína y condición testada) que cumplieran estos criterios, el número de intentos necesarios fue del orden de 50.000-100.000.

h) En el caso de las poliproteínas **(I27)₄-Q_{20/36/51}-(I27)₃**, basándonos en la disposición de los módulos de I27 en la poliproteína (4 y 3 módulos flanqueando la región

de polyQs), el criterio mínimo para estar completamente seguros de que la región de interés ($Q_{20/36/51}$) había sido sometida a fuerza fue la **presencia de al menos 5 picos de fuerza** correspondientes al desplegamiento del I27 marcador.

iAFM

La formación de fibras amiloides por parte de I27 + Sup35NM se evaluó mediante la incubación de una muestra de proteína purificada a 12,5 μ M en 10 mM Tris HCl/5 mM DTT [pH 7,5] durante 30 días a 37°C sin agitación y en presencia de 0,02% NaN_3 , utilizado como agente bacteriostático. Para la adquisición de imágenes mediante iAFM se utilizó una dilución 1:10 de la proteína y se añadió 1 mM de CaCl_2 al tampón experimental para facilitar la adsorción de las fibras a la mica, usada como sustrato. Una gota de la proteína diluida se depositó sobre mica recién exfoliada y se dejó incubar 15 minutos.

Para intentar formar fibras amiloides de $(\text{I27})_4\text{-}Q_{20/36/51}\text{-(I27)}_3$, se incubó una muestra de proteína purificada a una concentración de 12,8 μ M durante 30 días a 37°C sin agitación en presencia de 0,02% NaN_3 . Para la adquisición de imágenes por iAFM se utilizó una dilución 1:25 de la proteína en tampón PBS [pH 7,4].

La imagen de fibras amiloides tomada mediante iAFM de ubi + A53T α -syn se obtuvo mediante la incubación de la muestra (0,3 mM de una solución de proteína purificada en PBS [pH 7,4] + 0,02% NaN_3) durante 51 días a 37°C sin agitación. En primer lugar, se tomaron imágenes control de mica recién exfoliada en presencia de PBS (utilizando micropalanca MLCT-AUNM). Después de confirmar que la superficie estaba limpia, plana, y apta para adquisición de imágenes, se tomó una alícuota de 20 μ l de la muestra (tras resuspender suavemente el precipitado formado), se depositó sobre mica seca y se dejó adsorber durante 15 min. La gota se secó mediante la aplicación de un flujo muy suave de N_2 y luego se rehidrató con tampón PBS [pH 7,4] en la cámara de fluido del AFM. El procedimiento fue idéntico al utilizado anteriormente para tomar imágenes mediante iAFM de fibras amiloides de α -syn (Conway *et al.* 1998). Las imágenes fueron adquiridas en el modo dinámico de adquisición de imágenes (Valbuena *et al.* 2007).

Para todas las muestras, las imágenes se obtuvieron usando micropalanca de MLCT-AUNM (*Grupo Veeco Metrology*), en el modo dinámico de adquisición de imágenes (ver **Sección 8.1.1.1.2**), y usando mica como sustrato (Valbuena *et al.* 2007).

Análisis mediante CD

Los espectros de las proteínas de CD en el UV lejano, a concentraciones de 5-20 μ M en 10 mM KH_2PO_4 [pH 4,7], se obtuvieron a 20°C en un **espectropolarímetro JASCO-J810** (*JASCO Inc.*) equipado con una unidad Peltier de control de temperatura y utilizando cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico, tal como se describe en Varea *et al.* 2004. La contribución del tampón fue sustraída de los datos experimentales y los espectros corregidos fueron convertidos a **elipticidad molar** ($[\theta]$), utilizando las masas moleculares promedio por residuo, usando el **software Spectra Manager** (*Jasco Inc.*). Después de registrar el primer espectro de proteína con muestras recién purificadas y mantenidas a 4°C (considerado como día 0), la proteína fue incubada a 37°C sin agitación en presencia de 0,02% NaN_3 , y se obtuvieron espectros adicionales

en los días 2, 5 y 7 con el fin de analizar los cambios estructurales experimentados por la NP y la proteína usada como control VAMP2 durante el tiempo de incubación. También se monitorizaron los cambios estructurales sufridos por las NPs (y VAMP2) después de incubar las muestras en presencia de QBP1 o SV111, a una concentración de 20 μM y 100 μM respectivamente. La concentración final de DMSO en las muestras que contenían QBP1 se mantuvo por debajo de 0,01% (**Yoshitaka Nagai, comunicación personal**) para evitar la interferencia del DMSO con las medidas de ϑ . El contenido de estructura secundaria de cada proteína y su evolución en el tiempo se estimó por **deconvolución de espectros** utilizando el **programa de análisis CDNN** (Bohm *et al.* 1992). Para estimar el contenido de estructura secundaria de las NPs en las proteínas de fusión mínima portador+NP, se sustrajo la contribución del módulo portador.

Para las medidas de estabilidad térmica, se registró a 224 nm el cambio de ϑ inducido por el aumento de temperatura a una velocidad de calentamiento constante de 60°C/h. El tampón utilizado fue 100 mM NaP/100 mM NaCl [pH 7,4] y las muestras se utilizaron a concentraciones de entre 12,5 y 50 μM .

Análisis mediante DSC

Las medidas de DSC se realizaron sólo **en construcciones basadas en ubi** (α -syn y mutantes) debido a su alta estabilidad térmica (Wintrode *et al.* 1994), que la hace inadecuada para realizar medidas de estabilidad térmica mediante CD. Las concentraciones de proteína variaron desde 35 hasta 99 μM en 10 mM glicina/ácido acético [pH 3,0]; pH en el que la estabilidad de ubi se encuentra reducida respecto a un pH más fisiológico.

Los experimentos de DSC fueron llevados a cabo en un **microcalorímetro VP-DSC** (MicroCal, LLC), en el que las muestras se escanearon desde 10°C hasta 115°C a una velocidad de calentamiento de 50°C/h. Los datos se tomaron y analizaron usando el software **DSC-Origin**, como se describe en Varea *et al.* 2000.

Análisis mediante NMR

Con el fin de identificar posibles interacciones no nativas entre el módulo portador (ubi o I27) y la proteína huésped, o alteraciones estructurales del módulo portador o de la proteína huésped, se llevaron a cabo experimentos de NMR monodimensional en todas las proteínas de fusión sin marcadores de monomolecularidad. También se obtuvieron espectros ^1H 2D NOESY en algunas de las construcciones menos estables de portador + huésped, como I27 + VAMP2, I27 + Sup35NM y ubi + A53T α -syn. Para ello, muestras de proteínas concentradas (de 0,1 a 1 mM) se dializaron contra 10 mM KH_2PO_4 [pH de 4,6 a 4,7] + 10% de D_2O . Las medidas se realizaron a 25°C usando un **espectrómetro Bruker AV 800** (Bruker BioSpin) equipado con una criosonda con un gradiente en el eje z. La temperatura se calibró utilizando una muestra de etanol y la señal del grupo trimetilo del sodio 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato [$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{-Na}^+$] (DSS) se utilizó como referencia interna del desplazamiento químico (Markley *et al.* 1998). Para reducir la señal de agua presente en la muestra, se utilizó pre-saturación selectiva o un módulo WATERGATE (Piotto *et al.* 1992). El tiempo de mezcla para los experimentos ^1H 2D NOESY fue de 100 ms. Los espectros fueron analizados mediante el

software **TopSpin 2,0** (*Bruker BioSpin*). Las señales asignadas en los espectros de ubi e I27 se basaron en datos previamente descritos en la bibliografía (Di Stefano y Wand 1987; Improta *et al.* 1996).

TEM

Las muestras de proteínas de fusión mínima o NPs/VAMP2 aisladas, en presencia o ausencia de 20 μM QBP1 o 100 μM SV111, se incubaron durante 20-30 días a 37°C a una concentración de entre 10 a 40 μM en 10 mM Tris HCl [pH 7,5] en presencia de 0,02 % NaN_3 y sin agitación. Con el fin de comprobar la capacidad de formación fibras amiloides a la temperatura a la que las proteínas se almacenan antes de los experimentos de SMFS (4°C), muestras de Sup35NM, I27 + Sup35NM y pFS-2 + Sup35NM fueron incubadas a 20 μM en 10 mM Tris HCl [pH 7,5] + 0,02 % NaN_3 y sin agitación durante 29 días a 4°C.

El péptido sintético aislado A β 42 se compró a *Shangai RD Biosciences LTD*. Para los ensayos de fibrillogénesis, los monómeros de partida se prepararon disolviendo 4,0 mg A β 42 en 800 μl de hexafluoro-2-propanol (HFIP) durante 10-20 min a RT. La solución resultante fue alicuoteada en tubos Eppendorf siliconizados (70 μl), que fueron sometidos a una corriente suave de N_2 durante 5-10 minutos para evaporar el HFIP. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para la preparación de fibras amiloides de A β 42, cada alícuota se reconstituyó en 77,5 μl de DMSO mezclando suavemente con una pipeta. Después de 3-5 minutos, se añadieron 1,21 ml de H_2O obteniendo una concentración final de 60 μM . Finalmente, la adición de QBP1 hizo que A β 42 quedase a concentración final de 50 μM . QBP1 se ensayó en las siguientes concentraciones: 0, 100, 200, 500 y 1000 μM . Las imágenes de TEM se tomaron después de 13 días de incubación a 37°C sin agitación.

Las muestras correspondientes a (I27)₄-Q_{20/36/51}-(I27)₃ se incubaron a 37°C (sin agitación) a una concentración de 10 μM en PBS [pH 7,4] + 0,02% NaN_3 durante 28 días antes de tomar las imágenes.

Para todos los casos mencionados, se adsorbieron 10 μl de varias diluciones de la muestra (con concentraciones de 0,45 a 4,5 μM) sobre rejillas de cobre de 300 mallas recubiertas de carbono (*Ted Pella*) y fueron sometidas a tinción negativa usando 1-2% de acetato de uranilo (previamente filtrado para evitar los posible agregados formados) durante 30s, como se describe en Chen *et al.* 2009. Las rejillas recubiertas de carbón se ionizaron inmediatamente antes de ser usadas con el fin de aumentar su hidrofilia utilizando un aparato **Emitech K100X** (*Quorum Technologies*). La formación de fibras amiloides se analizó en un microscopio electrónico **JEOL 1200EX II** (*Jeol Limited*) equipado con una cámara CCD Megaview III (*Olympus Soft Imaging*). Las imágenes se adquirieron a un aumento de entre 30.000 y 150.000x y un voltaje de 80 kV.

Turbidimetría y ensayos de unión de Rojo Congo

Para realizar las medidas de **turbidimetría**, las muestras de proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas a una concentración de 12.5-50 μM en 10 mM Tris HCl [pH 7,5] + 0,02% NaN_3 , y de (I27)₄-Q_{20/36/51}-(I27)₃ a 10 μM en PBS/EDTA 0,2 mM/1 mM DTT [pH 7,4] + 0,02%

NaN₃, se incubaron a 37°C sin agitación en presencia o ausencia de 20 µM QBP1 o 100 µM de SV111. El proceso de agregación de las muestras se monitorizó indirectamente midiendo su turbidez, basada en dispersión de luz a 405 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible **Nanodrop** (Thermo Scientific).

Los ensayos de **unión del colorante Rojo Congo** se realizaron en muestras de proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas a una concentración de 10 µM en el tampón 10 mM Tris HCl [pH 7,5], previamente incubadas a 37°C sin agitación en presencia de 0,02% NaN₃. Después de un período de incubación apropiado (30 días), las soluciones de proteína se mezclaron con una solución filtrada, para eliminar posibles micelas formadas, de 30 µM de Rojo Congo disuelto en 5 mM de NaP/300 mM NaCl [pH 7,5] y se incubaron a RT durante 30 min. Los espectros UV-visible de estas mezclas se midieron en el espectrofotómetro UV-visible Nanodrop. La concentración de Rojo Congo unida a los agregados amiloides formados se determinó utilizando la siguiente ecuación: Rojo Congo (µmol/l) = $A_{540}/25,295 - A_{480}/46,306$ (Wurth *et al.* 2002).

Predicción computacional de orden/desorden en las proteínas estudiadas

Las predicción computacional de desorden para todas las proteínas analizadas en este estudio se realizó utilizando “**Predictores de Regiones Naturalmente Desordenadas**” **VL-XT** y **VL3** (*Predictor Of Naturally Disordered Regions*, PONDR, *Molecular Kinetics*). Estos predictores clasifican cada residuo de una secuencia determinada como ordenado o desordenado. PONDR VL-XT integra tres redes neuronales prealimentadas: el predictor VL1 usado para residuos no terminales (Li *et al.* 1999), y el predictor XT, que a su vez engloba dos predictores, para residuos del N y del C terminal (Li *et al.* 1999). PONDR VL3 es una red neuronal que combina predicciones de 30 redes neuronales para secuencias de proteínas completas (Obradovic *et al.* 2003). Dado que PONDR VLXT y VL3 utilizan parámetros y tamaños de ventana diferentes, y además están entrenados en bases de datos muy diferentes, sus resultados pueden ser bastante diferentes: PONDR VL3 es uno de los predictores más precisos para regiones largas desordenadas en proteínas y, debido a su mayor ventana de promediado, proporciona curvas relativamente lisas. Por otro lado, PONDR VLXT es muy sensible a detalles más finos de secuencia y es utilizado con frecuencia para identificar características de secuencia potencialmente asociadas con la función de la proteína bajo estudio.

4. Resultados

4. Resultados

SMFS estándar (estrategia “flanqueante”) y controles de agregación/amiloidogénesis

La caracterización inequívoca de **IDPs no fibrillogénicas** por SMFS se ha realizado previamente aplicando una estrategia de poliproteínas clásica. Dicha estrategia supone el uso de poliproteínas flanqueantes “en serie” de la proteína de interés y mediante ella, se ha demostrado que IDPs sin capacidad de agregar formando estructuras amiloides, presentan un patrón de estiramiento-desplegamiento que no presenta picos de fuerza, como es el caso de PEVK de titina (Li *et al.* 2001), N2B de titina (Li *et al.* 2002; Watanabe *et al.* 2002) y VAMP2 en la presente tesis.

Sin embargo, las NPs implicadas en neurodegeneración, como parte de las **IDPs fibrillogénicas**, plantean un desafío adicional ya que son moléculas cuyos monómeros fluctúan entre distintas conformaciones y que por tanto presentan un importante polimorfismo conformacional mecánico que incluye especies de muy baja estabilidad mecánica (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009; Wegmann *et al.* 2011). En el modo *length-clamp* de SMFS, los picos de fuerza en los espectros fuerza-extensión aparecen generalmente ordenados en orden jerárquico de menor a mayor valor de estabilidad, por lo que los confórmeros de NPs con valores bajos de estabilidad, menor que la del marcador de molécula individual usado, normalmente I27 (Carrión-Vázquez *et al.* 1999) o ubi (Carrión-Vázquez *et al.* 2003), serán recogidos en la zona proximal de los registros. Esta zona del registro es propensa a estar “contaminada” por picos de fuerza provenientes de interacciones inespecíficas no deseadas como eventos de desanclaje de diferentes partes del sistema (punta y/o sustrato) y eventos que no corresponden a moléculas individuales, sino a múltiples moléculas en paralelo (**Sección 1.3.2.1.2, Fig. 1-16**). Todo ello genera un espectro fuerza-extensión muy complejo, difícilmente analizable. Este problema también ha estado presente en el análisis de IDPs no fibrillogénicas tipo N2B y PEVK y en cualquier proteína en general, sin embargo, dado que las NPs no presentan un patrón de despliegamiento definido, sino que producen picos de fuerza de diferente magnitud con valores variables de ΔL_c , el uso de poliproteínas flanqueantes combinado con la medida del ΔL_c , constituyen una condición necesaria, pero no suficiente para la **identificación inequívoca de moléculas individuales**.

Por tanto, teniendo en cuenta el comportamiento polimórfico que presentan las NPs, no es de extrañar que en los escasos estudios de SMFS previos sobre NPs no se haya extraído información directa sobre la proteína de interés; polyQs, (Dougan *et al.* 2009), o se hayan visto obstaculizados por la posible existencia de ruido contaminante; α -syn, (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009) y tau (Wegmann *et al.* 2011). Dichos estudios adolecen de tres problemas graves que podrían estar interfiriendo con los resultados obtenidos, contaminando las conclusiones que de ellos se desprenden. En primer lugar, en ellos se utiliza una estrategia basada en poliproteínas estándar, donde las repeticiones marcadoras de molécula individual, I27, fueron fusionadas a la NP bajo estudio, por lo que los datos obtenidos en los espectros fuerza-extensión **se pueden encontrar contaminados en la región proximal**, poniendo así en peligro la fiabilidad de los mismos. En segundo lugar, **el comportamiento amiloidogénico natural de la NP fusionada a la poliproteína no fue testado**, pudiendo comportarse de

manera anómala al encontrarse flanqueada por módulos de proteína marcadora. Por último, en dichos estudios no se aportaron pruebas convincentes que demostraran que los datos presentados se originasen *bona fide* a partir de interacciones intramoleculares. Ppor tanto, no se puede descartar la presencia de interacciones intermoleculares, comunes en este tipo de proteínas, cuyos monómeros interaccionan entre sí para formar oligómeros y finalmente fibras amiloides, u otro tipo de interacciones que no son de interés.

En la presente tesis todas estas limitaciones han sido abordadas, lo que ha revelado la existencia de un rico polimorfismo conformacional mecánico en el monómero de las NPs estudiadas, que a su vez está relacionado con el proceso de amiloidogénesis y neurotoxicidad. Sin embargo, el camino para conseguirlo ha sido largo y no ha estado exento de problemas. Como primera aproximación experimental utilizamos la estrategia estándar en serie. Para ello, se construyeron poliproteínas heteroméricas que constaban de trectos de polyQ de diferente longitud, Q₂₀, Q₃₆ y Q₅₁, flanqueados por un par de residuos de K seguido de repeticiones de I27 de titina cardíaca humana como poliproteína marcador de monomolecularidad (**Fig. 4-1a**). Sin embargo, como se ha discutido anteriormente, gran parte de los registros obtenidos presentaban pequeños picos de fuerza en la región proximal de difícil interpretación (**Fig. 4-1b**, derecha), similar a lo descrito previamente para α -syn (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009). Por tanto, no se podía descartar la posibilidad de que los picos de fuerza observados procediesen de interacciones inespecíficas en lugar del desplegamiento de estructuras formadas por las polyQs. Los residuos de K a ambos lados de la NP se han utilizado previamente con éxito para mejorar la solubilidad de polyQs ya que las repulsiones electrostáticas retardarían la cinética de reacción de agregación. Por tanto, se puede especular que dicho efecto, junto con posibles restricciones estéricas y de movilidad al introducir módulos plegados a ambos lados de la NP, podría prevenir la adquisición de una conformación estructurada de las polyQs con tendencia a agregar. En este sentido, el efecto sobre la capacidad de agregación de secuencias flanqueantes de polyQs ha sido ampliamente documentado (Perutz *et al.* 1994; Venkatraman *et al.* 2004). De este modo, es lógico pensar que los picos de fuerza de difícil interpretación que caen en la región proximal se deban a interacciones inespecíficas, más que al desplegamiento de conformaciones adoptadas por la secuencia de polyQs.

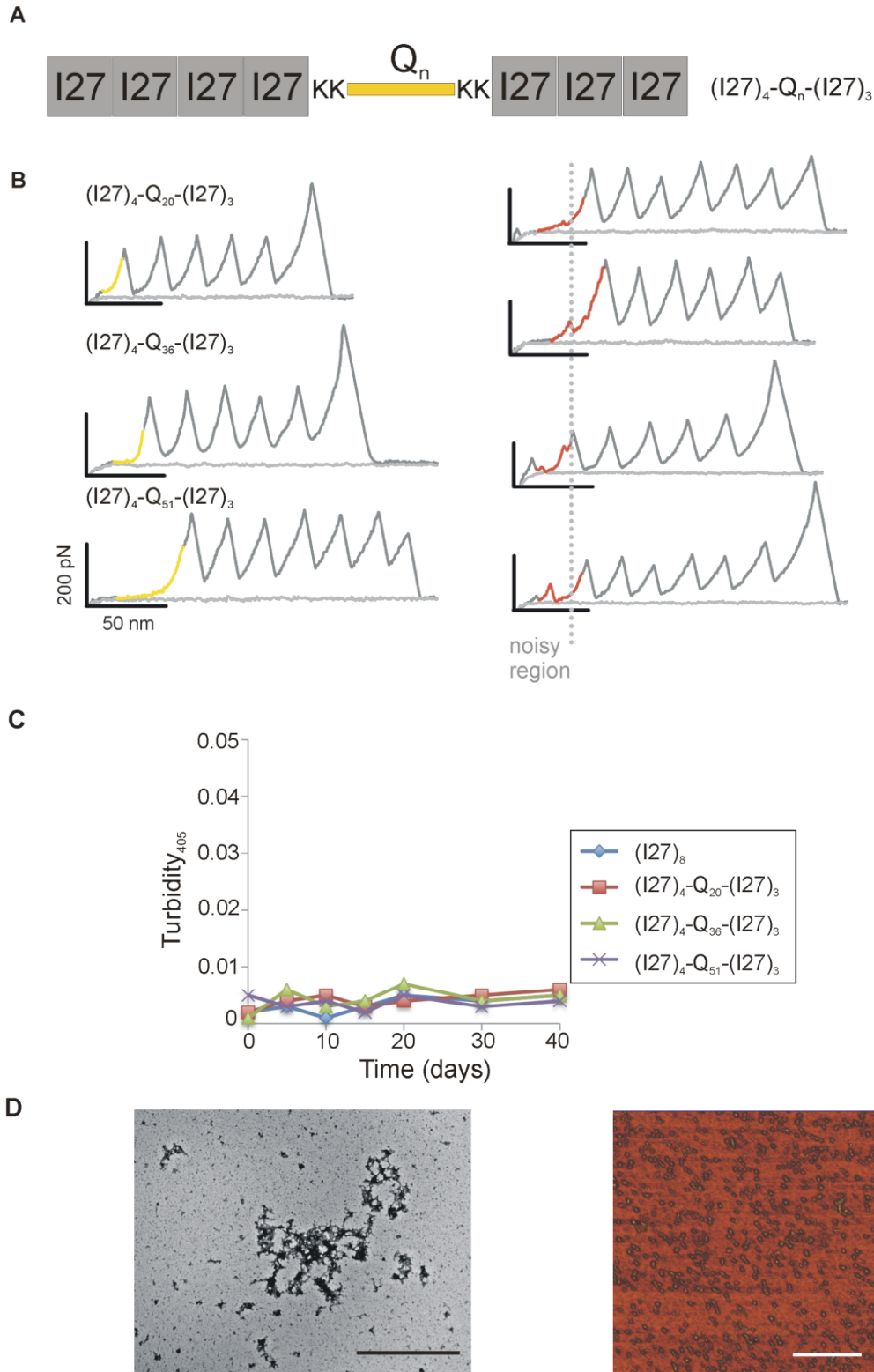


Figura 4-1. Enfoque de heteropoliproteína estándar (en serie) para el análisis nanomecánico de polyQs.

a) Representación esquemática de la estrategia basada en heteropoliproteínas en serie utilizada en este análisis: $(I27)_4-Q_n-(I27)_3$. Esta estrategia es conceptualmente similar a la recientemente utilizada para el análisis nanomecánico de α -syn (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009) y tau (Wegmann *et al.* 2011). Dos residuos de lisina se colocaron flanqueando los diferentes trectos de polyQs para mejorar la solubilidad de las heteropoliproteínas (Venkatraman *et al.* 2004). **b)** Espectros fuerza-extensión de las poliproteínas indicadas. Las curvas de la izquierda muestran registros típicos para una conformación no mecanoestable (NM, en naranja) mientras que hipotéticos cónfórmeros mecanoestables (M, en rojo) de $(I27)_4-Q_{51}-(I27)_3$

se mostraron a la derecha. Dado que estos picos de fuerza se encuentran en la región proximal de los espectros, frecuentemente contaminada, no se puede demostrar de manera inequívoca que provengan de verdaderos confórmers M del monómero de NP. **c)** Turbidimetría de $(I27)_4$ -Q_n-(I27)₃ monitorizada mediante absorbancia a 405 nm durante el período de incubación a 37°C. La falta de turbidez sugiere una incapacidad de agregar de dichas construcciones (Nagai *et al.* 2000; Nagai *et al.* 2007). **d)** Imagen de $(I27)_4$ -Q₅₁-(I27)₃ obtenida por TEM después de 28 días de incubación de la muestra a 37°C (izquierda), donde no se observaron fibras amiloides. La imagen fue adquirida a 30.000× y la barra de escala corresponde a 1 μm. Imagen de $(I27)_4$ -Q₅₁-(I27)₃ obtenida por iAFM después de 30 días de incubación de la muestra a 37°C (a la derecha) en la que tampoco se observaron fibras amiloides. La imagen fue adquirida usando el modo dinámico de imagen en medio líquido como se describe en Valbuena *et al.* 2007. La barra de escala corresponde a 0,5 μm.

Por otro lado, la realización de controles de agregación/amiloidogénesis debe ser un prerrequisito siempre que otra proteína sea fusionada a una NP (Sambashivan *et al.* 2005; Teng y Eisenberg 2009; Zhao *et al.* 2011) ya que es necesario demostrar que la NP conserva su capacidad natural de comportarse como una proteína amiloidogénica. Sin embargo, el enfoque estándar que empleamos inicialmente lamentablemente producía poliproteínas de fusión que ni eran capaces de agregar, según pruebas de turbidimetría a 405 nm (**Fig. 4-1c**), en las que se mide dispersión de luz provocada por especies grandes (agregadas) en la muestra (Nagai *et al.* 2000), ni de formar fibras amiloides, de acuerdo con un análisis que consistió en la adquisición de imágenes mediante TEM y AFM (**Fig. 4-1d**).

Con estos datos podemos concluir que la NP flanqueada es incapaz de agregar y, por tanto, probablemente los picos de fuerza que se obtuvieron (**Fig. 4-1b**), fuesen debidos a interacciones inespecíficas. Para poder obtener datos limpios y fiables, a partir de construcciones donde la naturaleza amiloidogénica de la NP estuviese preservada, resultó evidente la necesidad de desarrollar una nueva estrategia.

Análisis inequívoco de SMFS (estrategia “portador-huésped” y controles de preservación de estructura y de agregación/amiloidogénesis)

Para superar los problemas mencionados, decidimos abandonar el **enfoque convencional** basado en la **poliproteína flaqueando la NP**. De esta forma, para el análisis inequívoco de IDPs fibrillogénicas, desarrollamos en el laboratorio una nueva estrategia basada en la modificación del vector de expresión llamado “plásmido para espectroscopía de fuerzas, **pFS**” (Oroz *et al.* 2012).

La modificación del pFS para el análisis de IDPs mediante SMFS se ha llamado **pFS-2** (**Fig. 4-2**). En esta nueva estrategia, en lugar de clonar la proteína de interés intercalada entre poliproteínas, mecánicamente en serie (Steward *et al.* 2002), la proteína es insertada, a modo de huésped, en un bucle tolerante de un módulo usado como **portador**. Dicho módulo portador puede ser el módulo I27 de titina cardíaca humana o ubi, ambas consideradas proteínas modelo en nanomecánica de proteínas (ver sección de **Materiales y Métodos**). En esta estrategia “portador-huésped”, la proteína huésped (IDPs en esta tesis), se encuentra protegida mecánicamente en el interior del portador (**Fig. 4-2a**). Por ello, la proteína huésped comenzará a sentir la fuerza siempre después que se haya desplegado el módulo portador y, por tanto, su señal de aparecerá lejos de la región ruidosa proximal de los espectros fuerza-extensión, a diferencia de los trabajos citados anteriormente (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009;

Wegmann *et al.* 2011) y de nuestra propia estrategia inicial (**Fig. 4-1b**). Además, el vector pFS original incorporaba un fragmento de una IDP no amiloidogénica, el polipéptido N2B de titina cardíaca humana, que no ofrece resistencia al estiramiento (Li *et al.* 2002), que actúa como un puente espaciador de la zona proximal de los espectros, zona generalmente contaminada por interacciones inespecíficas (ver **Sección 1.3.2.1.2**), evitando así la posible contaminación de los datos.

Con el fin de demostrar que la inserción de una proteína cualquiera dentro de un modulo portador no modifica las propiedades mecánicas del huésped, se insertó dentro de la ubi usada como portadora un módulo de I27, cuyas las propiedades nanomecánicas han sido ampliamente estudiadas por SMFS. En la **Figura 4-2d,e** se observa que sus propiedades mecánicas no se encuentran alteradas, y el I27 insertado presenta unos valores de F_u e ΔL_c totalmente comparables a los reportados en la bibliografía cuando es estirado sin protección mecánica (Carrión-Vázquez *et al.* 1999). En consecuencia, podemos asumir razonablemente que las propiedades nanomecánicas de las IDPs analizadas serán comparables a las que serían obtenidas si fuesen medidas de manera aislada.

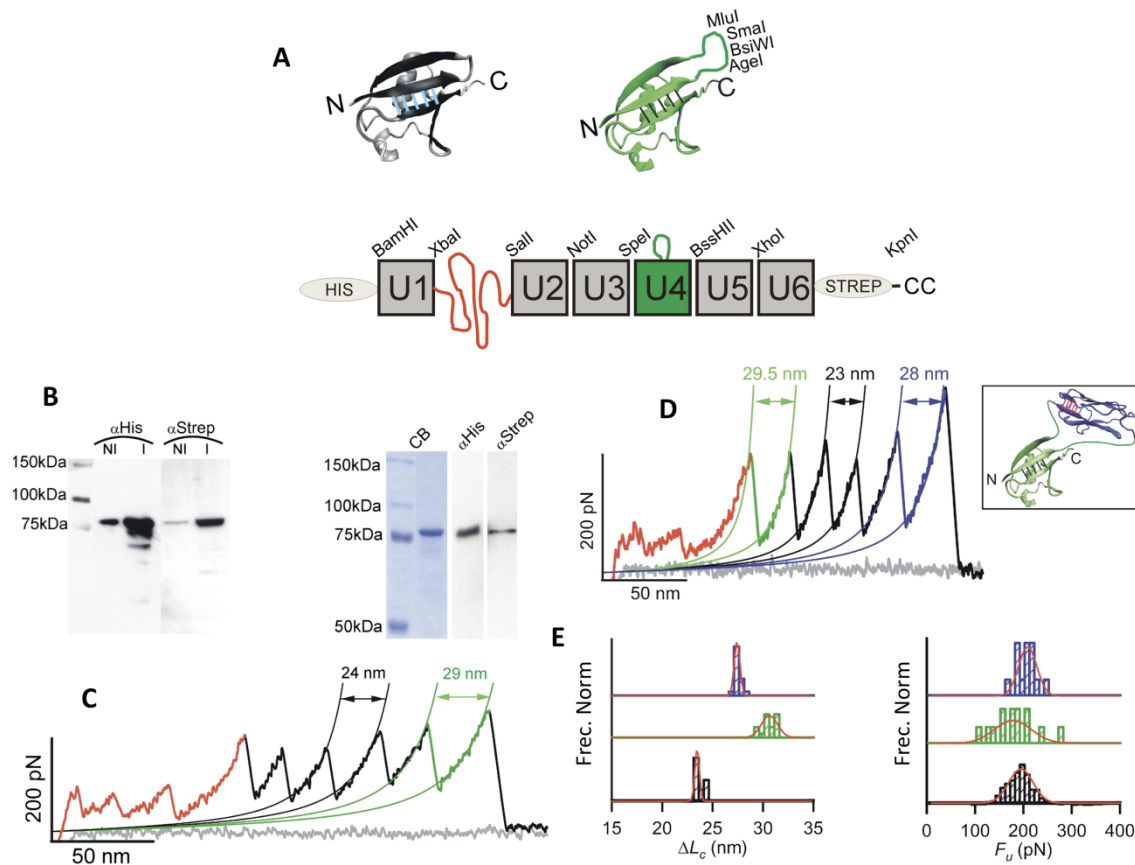


Figura 4-2. Estrategia de la proteína portadora basada en el pFS-2. a) Arriba: Representación de la estructura de ubi (código PDB 1D3Z, izquierda) y ubi + MCS (derecha). El MCS está insertado en bucle AB entre los residuos T9 y G10. Dicho MCS se compone de 14 aminoácidos y contiene sitios de restricción para las enzimas Agel, BsiWI, SmaI y MluI. Las estructuras atómicas fueron visualizadas con VMD 1.8.6 (Humphrey *et al.* 1996). Abajo: Representación esquemática de la poliproteína pFS-2. **b)** Western blot para seguir la inducción de la expresión de la poliproteína pFS-2 clonada en el vector pRSETA (Stratagene). La masa molecular nominal de la poliproteína es de 82 kDa, de acuerdo con ProtParam (izquierda). Tras la purificación de la poliproteína recombinante pFS-2, se observó una sola banda tras tinción con Coomassie e igualmente en Western Blot usando dos anticuerpos diferentes (derecha). **c)**

Espectro fuerza-extensión típico de pFS-2 que consta, en orden, de los siguientes elementos; la región N2B (rojo), picos de ubi marcadora (negro) y ubi + MCS (verde). El pico correspondiente al desplegamiento de ubi + MCS puede ser identificado fácilmente porque presenta un valor de ΔL_c más grande debido a la inserción del MCS en la secuencia de cDNA de ubi. **d)** Registro fuerza-extensión de pFS-2 + I27 típico que consta (en orden) de los siguientes elementos; el fragmento de N2B (rojo), el pico de desplegamiento de la ubi portadora (verde), tres picos de repeticiones de ubi marcadora (negro) y el pico correspondiente al desplegamiento del I27 huésped (azul). Nótese que el pico de desplegamiento de la ubi portadora debe preceder siempre al pico de desplegamiento del I27 huésped. La ubi portadora muestra un valor de ΔL_c más grande de lo normal debido a la inserción del MCS y el I27 plegado en su interior. El recuadro muestra una representación de ubi + I27 (I27 en la parte superior; código PDB 1TIT), visualizado por VMD 1.8.6. **e)** El análisis de los valores de ΔL_c de los elementos de esta construcción (izquierda) muestra que los valores de desplegamiento para la ubi marcadora (parte inferior), ubi portadora (medio) e I27 huésped (parte superior) se conservan. Histogramas de F_u de los distintos módulos de la construcción (en el mismo orden, derecha). Ambos histogramas muestran que la estrategia de la proteína portadora no altera las propiedades mecánicas de los módulos implicados. Todas las distribuciones fueron normalizadas y ajustadas a una gaussiana.

Como consecuencia, esta estrategia se empleó para estudiar cuatro IDPs amiloidogénicas, tres NPs humanas representativas (diferentes longitudes de polyQs, A β 42 y α -syn) y un prion de levadura que ha sido ampliamente utilizado como modelo de prion humano (Sup35NM, que a lo largo del texto será tratado como una NP más). Estas NPs pertenecen al grupo de las IDPs amiloidogénicas (Uversky y Dunker 2010), y están íntimamente relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas más representativas: enfermedades causadas por expansión del triplete CAG (polyQs, trastornos familiares tales como la enfermedad de Huntington y diferentes ataxias espinocerebelosas), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y las enfermedades priónicas, respectivamente (Chiti y Dobson 2006; Uversky y Dunker 2010). Todas estas NPs, incluyendo A β (LaFerla *et al.* 2007), se encuentran en el interior celular y por tanto, son susceptibles de constituir potenciales sustratos de la maquinaria de procesamiento proteico de la célula (Hinault *et al.* 2006), lo que implica que su estabilidad mecánica es un factor importante a tener en cuenta (ver **Sección 1.3.1**). Adicionalmente, y como control negativo, se analizó una IDP no amiloidogénica, el fragmento citoplásmico de VAMP2 (Hazzard *et al.* 1999).

Antes de comenzar a realizar un análisis nanomecánico exhaustivo por SMFS de estas proteínas, se comprobó si las **propiedades estructurales del portador**, así como las **propiedades estructurales y amiloidogénicas de las NPs** se mantienen **inalteradas** en nuestras construcciones (segunda limitación de los estudios de SMFS mencionados anteriormente). Para ello, se caracterizó la estructura, estabilidad y capacidad de agregación y amiloidogénesis de las nuevas construcciones utilizando una batería de técnicas espectrofotométricas, estructurales y computacionales (**Figs. 4-3 a 4-10**). Con este fin, por simplicidad técnica, en estos experimentos se utilizó la **proteína de fusión neurotóxica mínima**, es decir, el portador + huésped (I27/ubi + NP) sin el marcador de poliproteína codificado en el vector pFS-2.

Una de las premisas esenciales para llevar a cabo el análisis de SMFS basado en esta estrategia es que **resulta esencial que la integridad de la proteína portadora se mantenga**, al menos en un número considerable de moléculas, para así poder detectar su desplegamiento en SMFS, momento a partir del cual la proteína incorporada en su interior comienza a sentir la fuerza. Por tanto, se examinó la estructura y estabilidad térmica del portador tras la inserción de la IDP. Nuestros resultados muestran que, aunque su estabilidad termodinámica se

encuentra reducida al insertar el huésped (Fig. 4-3), la proteína portadora se mantiene esencialmente plegada (Fig. 4-4 y 4-5). Estudios previos en otras proteínas han reportado resultados similares; la inserción de una región de polyQs supone una disminución en la estabilidad termodinámica de mioglobina (Tanaka *et al.* 2001), mientras que la RNasa conserva su plegamiento; en este último caso no fueron realizadas medidas termodinámicas para determinar el efecto de la inserción de polyQs sobre la estabilidad del portador (Sambashivan *et al.* 2005). El efecto desestabilizador como consecuencia de la inserción de un bucle largo en el plegamiento de una proteína ha sido estudiado tanto teórica como experimentalmente y se ha encontrado que es dependiente del tipo de residuo insertado y de la estructura adoptada. Para bucles flexibles con tamaño similar a las NPs utilizadas en este estudio se espera una desestabilización de aproximadamente 2 kcal/mol, aunque podría ser mayor si la NP adoptase una conformación más rígida (Wang *et al.* 2005). El efecto desestabilizador observado en este trabajo mediante experimentos de desnaturalización térmica mediante CD y DSC (Fig. 4-3), se encuentra en el rango de la desestabilización teórica predicha.

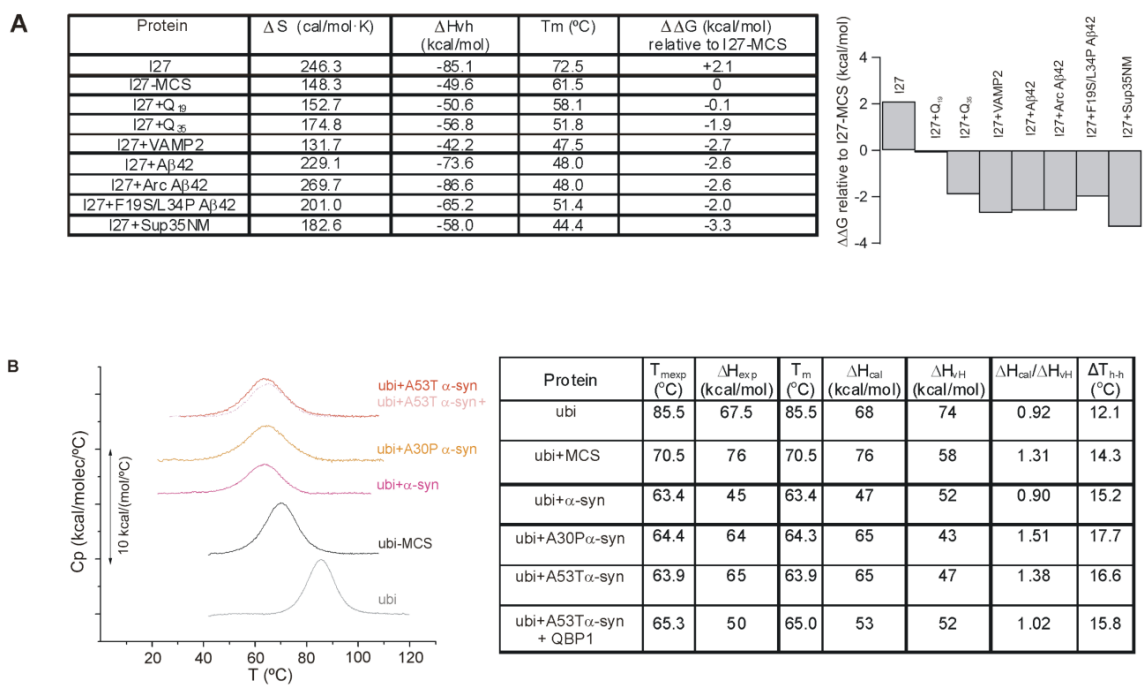


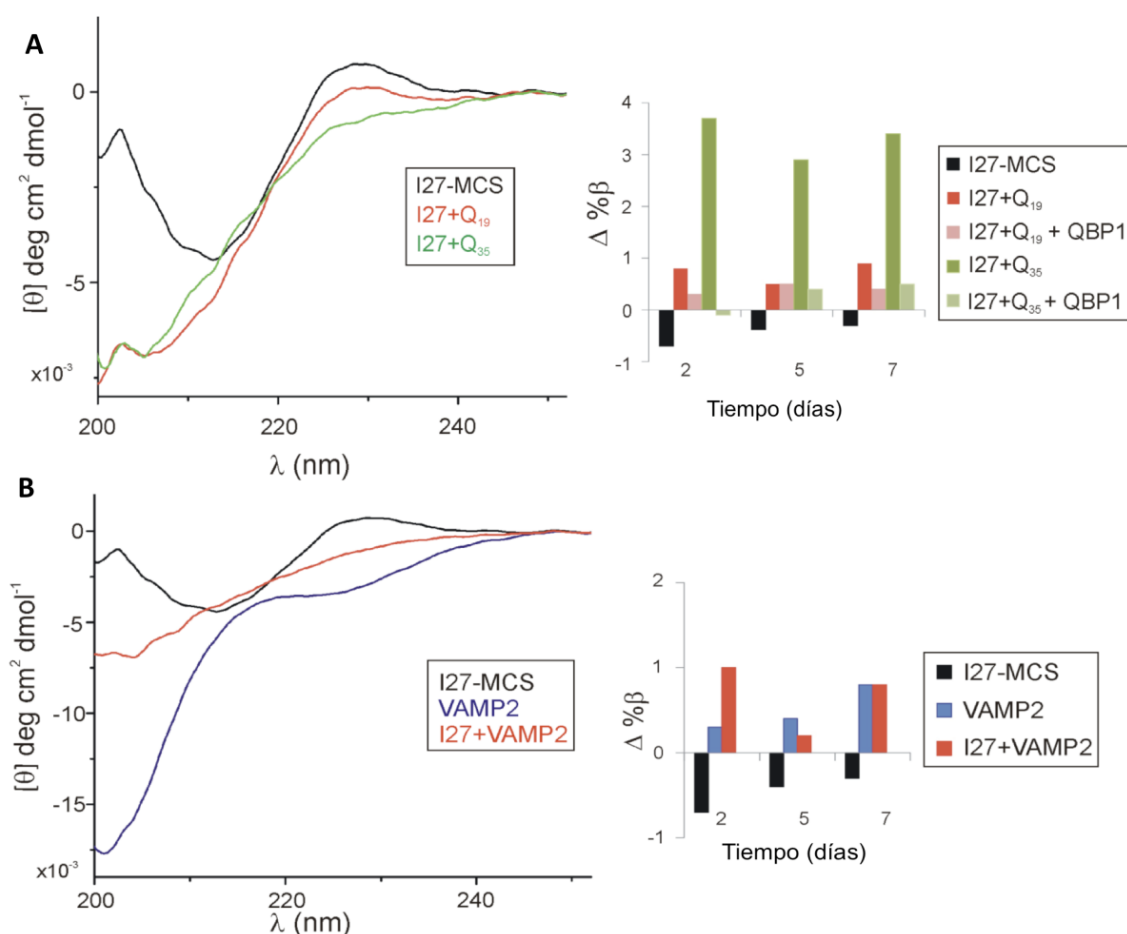
Figura 4-3. Estabilidad termodinámica de la proteína portadora tras la inserción del huésped. a) Parámetros de desnaturalización térmica obtenidos por espectroscopía de CD asumiendo un modelo de equilibrio de dos estados ($N \leftrightarrow D$), con líneas de base pre-y post-transición linealmente dependientes de la temperatura (Santoro y Bolen 1988). La temperatura de transición media (T_m) y el cambio de entalpía de van't Hoff (ΔH_{vh}) derivaron directamente del ajuste, mientras que el cambio de entropía de desnaturalización (ΔS) se calculó utilizando la ecuación de Gibbs (Pace y Scholtz 1997). El cambio en la estabilidad conformacional en relación con I27 + MCS ($\Delta \Delta G$) se calculó usando la siguiente ecuación;

$$\Delta \Delta G \approx \Delta S \cdot \Delta T_m,$$

donde ΔT_m es la diferencia en el valor de T_m para una cualquier construcción relativa a I27-MCS (Becktel y Schellman 1987). El valor de ΔS utilizado fue $193 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, que es el valor medio de todas las variantes. La reversibilidad del proceso de desnaturalización se determinó mediante la comparación de espectros de proteínas nativas, antes de su desnaturalización inducida térmicamente, con los obtenidos

después de volver a enfriar rápidamente las muestras calentadas. Todas las muestras analizadas fueron reversibles, con la excepción de I27-MCS. En este caso, el residuo de prolina insertado en el bucle interfiere con el plegamiento de la proteína como ocurre en otros casos descritos (Pradeep *et al.* 2006). **b)** Curvas de DSC de las de proteínas indicadas y resumen de los parámetros de desnaturalización (T_{mexp} , valor de T en C_{pmax} ; ΔH_{exp} , cambio de entalpía estimada por integración de la curva de DSC; T_m , ΔH_{cal} , y ΔH_{vH} ; temperatura media de transición, calorimétrica y cambio de la entalpía de van't Hoff estimados a partir de deconvolución endoterma, y ΔT_{h-h} , anchura de la curva a media altura). La inserción de A30P o A53T α -syn en la ubi portadora aumenta significativamente la entalpía de desnaturalización cuando se compara con la inserción de α -syn wt. Además, la relación entre ΔH_{cal} , y ΔH_{vH} es superior a la unidad, lo que sugiere una tendencia hacia la formación de intermedios durante el desplegamiento. Este efecto desaparece después de la adición de un exceso de QBP1 (50 μ M) en ubi + A53T α -syn, desnaturalizándose siguiendo un modelo de dos estados. La reversibilidad de las transiciones térmicas fue evaluada por recalentamiento de las muestras previamente calentadas y enfriadas. La variación de la velocidad de calentamiento no modificó significativamente las curvas experimentales, lo que indica una influencia débil de la irreversibilidad en el intervalo de temperatura donde ocurrió la desnaturalización.

A pesar de la mostrada disminución en estabilidad termodinámica, el plegamiento del portador en general se conservó, de acuerdo con las medidas de CD en el UV lejano (**Fig. 4-4**) y los espectros 1D 1H y 2D 1H NOESY NMR (**Fig. 4-5**).



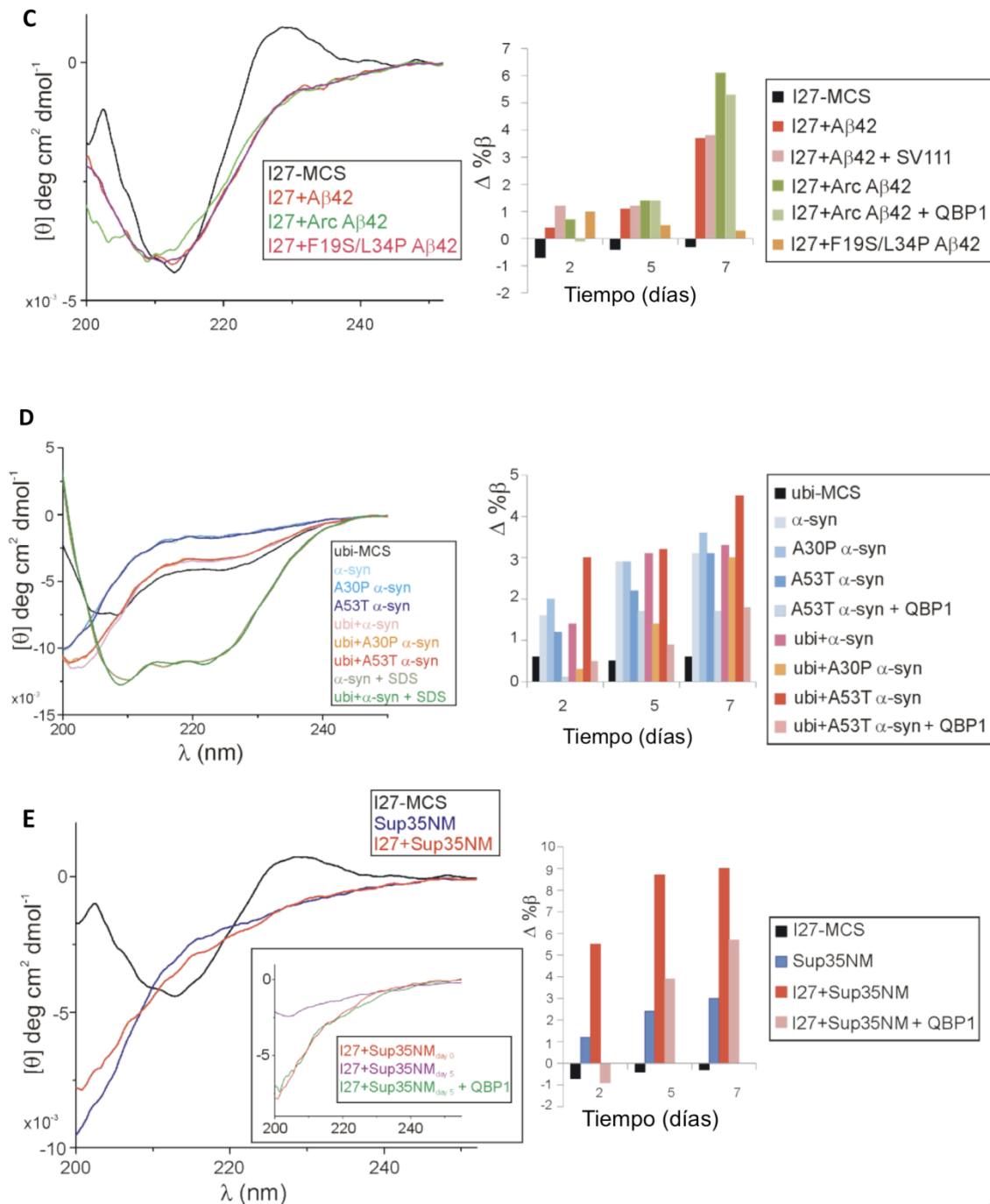
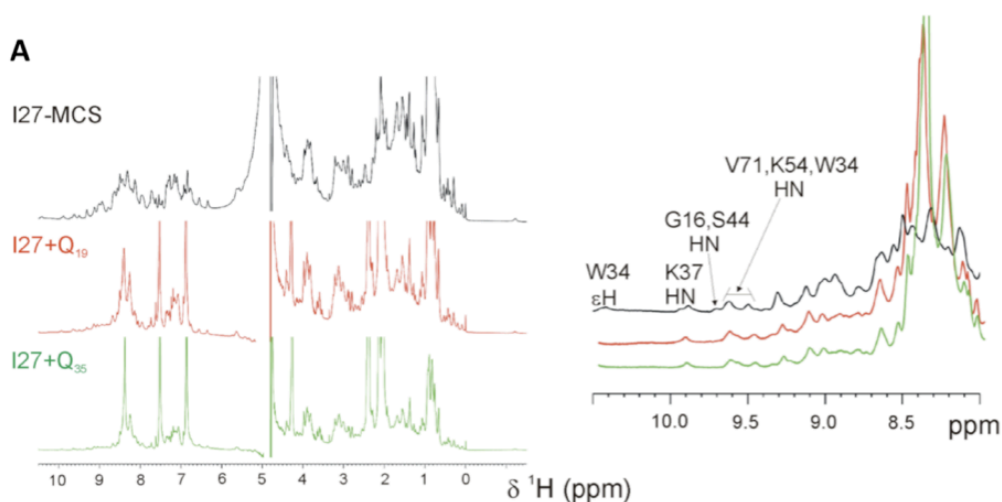
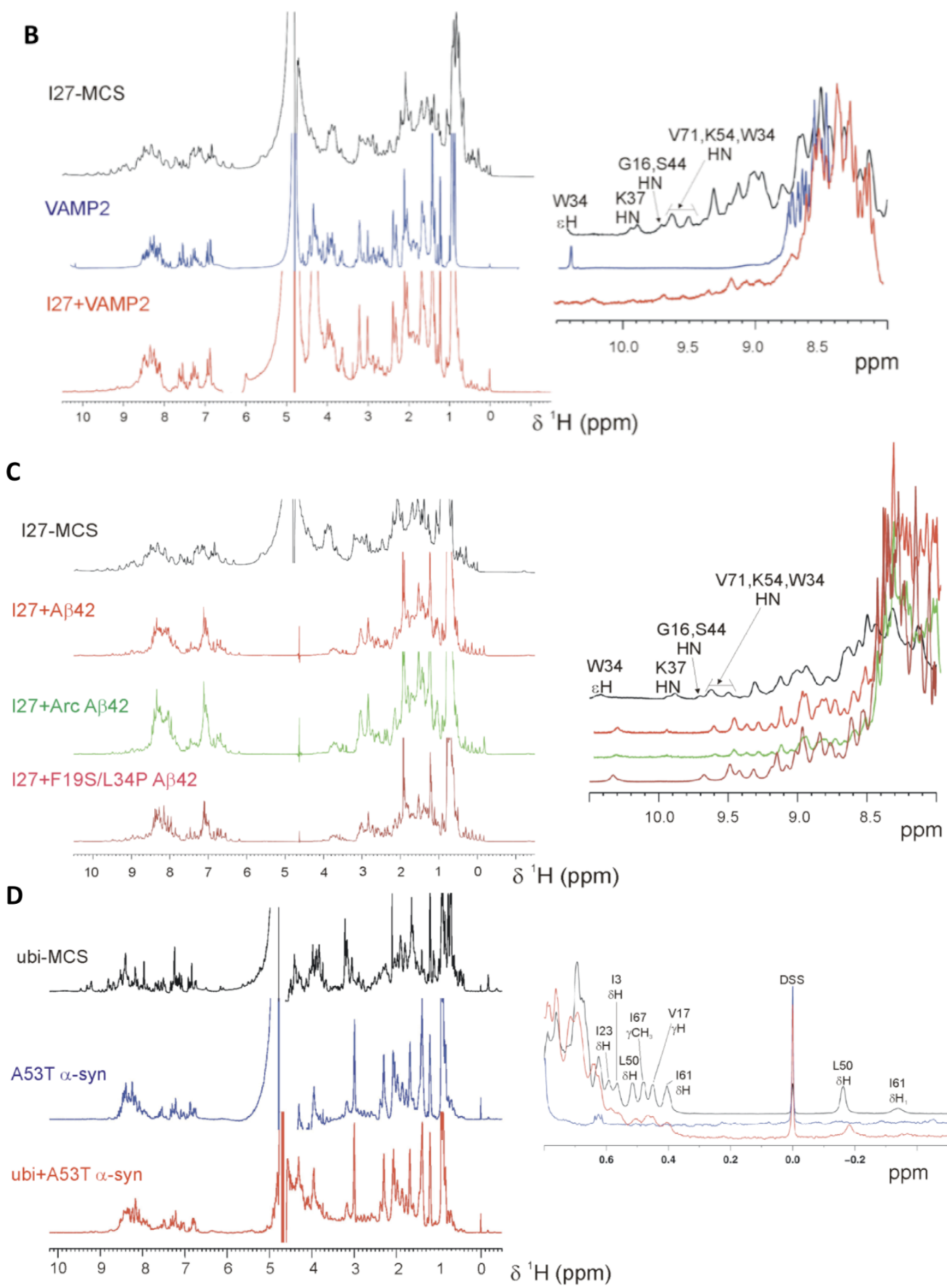


Figura 4-4. Análisis por CD de las proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas. a) Espectros de CD en el UV lejano (izquierda) y estimación del contenido en estructura β durante un período de incubación a 37°C con relación al día 0 ($\Delta\% \beta$) de polyQs, entendiéndose como día 0 el momento en que se obtienen las muestras purificadas (derecha). Los espectros de CD indican que tanto Q₁₉ como Q₃₅ fusionados al I27 portador permanecen como conformaciones desordenadas a día 0 ($[\theta]$ = elipticidad molar por residuo). La deconvolución de los espectros tomados a diferentes tiempos de incubación indica que QBP1 reduce el incremento de contenido de estructura β en I27 + Q₃₅ b) Espectros de CD en el UV lejano (izquierda) y estimación del contenido de estructura β durante un período de incubación de VAMP2 a 37°C (derecha). Considerando que el error experimental es aproximadamente de 1% $\Delta\beta$, no se observó ningún aumento significativo de estructura β para ninguna de estas construcciones. c) Espectros de CD en el UV lejano (izquierda) y estimación del contenido de estructura β durante un período de incubación de A β 42 a 37°C (derecha). F19S/L34P A β 42 no sufre transiciones estructurales durante la incubación a 37°C, y la presencia de los péptidos QBP1 y SV111 no parece tener ningún efecto (derecha), de acuerdo con nuestros resultados de SMFS (véase Fig. 4-14). d) Espectros de CD en el UV lejano (izquierda) y estimación

del contenido de estructura β durante un período de incubación de α -syn a 37°C (derecha). El módulo ubi muestra un espectro típico de una proteína α/β (Radley *et al.* 2003), mientras que los distintos espectros de α -syn (wt y mutantes) presentan características de ovillo estadístico (RC, del inglés *Random Coil*, Weinreb *et al.* 1996). Los espectros de las construcciones portador + huésped están correlacionados con la suma ponderada de los espectros del portador y el huésped, teniendo en cuenta la contribución relativa de las respectivas secuencias en la proteína de fusión (no mostrado). Esto indica que α -syn insertada en ubi sigue siendo esencialmente desordenada. La presencia de membranas se mimetizó con el uso de 1mM del detergente SDS y tanto α -syn aislada como dentro de ubi adopta una conformación α -helicoidal, como previamente se había descrito mediante CD y RMN (Ulmer *et al.* 2005). α -syn (wt y mutantes, tanto aisladas como fusionadas a ubi) adquieren estructura β durante la incubación a 37°C, efecto que se suprime o se ve disminuido en presencia de QBP1 (derecha). **e).** Espectros de CD en el UV lejano (izquierda) y estimación del contenido de estructura β durante un período de incubación de Sup35NM a 37°C (derecha). Los espectros de CD indican que Sup35NM permanece desordenado cuando es fusionado al módulo portador I27. El espectro de CD de I27 + Sup35NM es muy similar a la suma ponderada de los espectros por separado de I27 y Sup35NM, asumiendo la contribución relativa de sus respectivas secuencias en la proteína de fusión (no mostrado). Mientras que el espectro tomado a día 5 (resaltado en un recuadro) indica que la conformación predominante es RC, el análisis espectral revela un aumento significativo de estructura β (panel derecho). Nótese que el espectro de CD a día 5 ha perdido intensidad, posiblemente debido a la oligomerización y formación de agregados insolubles (véase **Fig. 4-6e, 4-7 y 4-9e**). QBP1 (20 μ M) inhibe el proceso de oligomerización, reduciendo la formación de estructura β . Como se aprecia, I27 + Sup35NM adquiere más estructura β que Sup35NM aislado. Esto podría deberse al posicionamiento próximo de los extremos de Sup35NM cuando está insertado dentro del I27, lo que podría alentar más rápidamente la formación de contactos que favoreciesen la agregación.

La espectroscopía 1D ^1H y 2D ^1H NOESY NMR muestra evidencias concluyentes que indican la presencia de proteína portadora completamente plegada en todas las preparaciones (**Fig. 4-5**), aunque, en algunas muestras, una fracción significativa de proteína portadora parecía encontrarse desnaturalizada. Cabe destacar que los portadores que están desplegados no producen picos de fuerza en SMFS y por tanto, habrían sido excluidos del análisis nanomecánico.





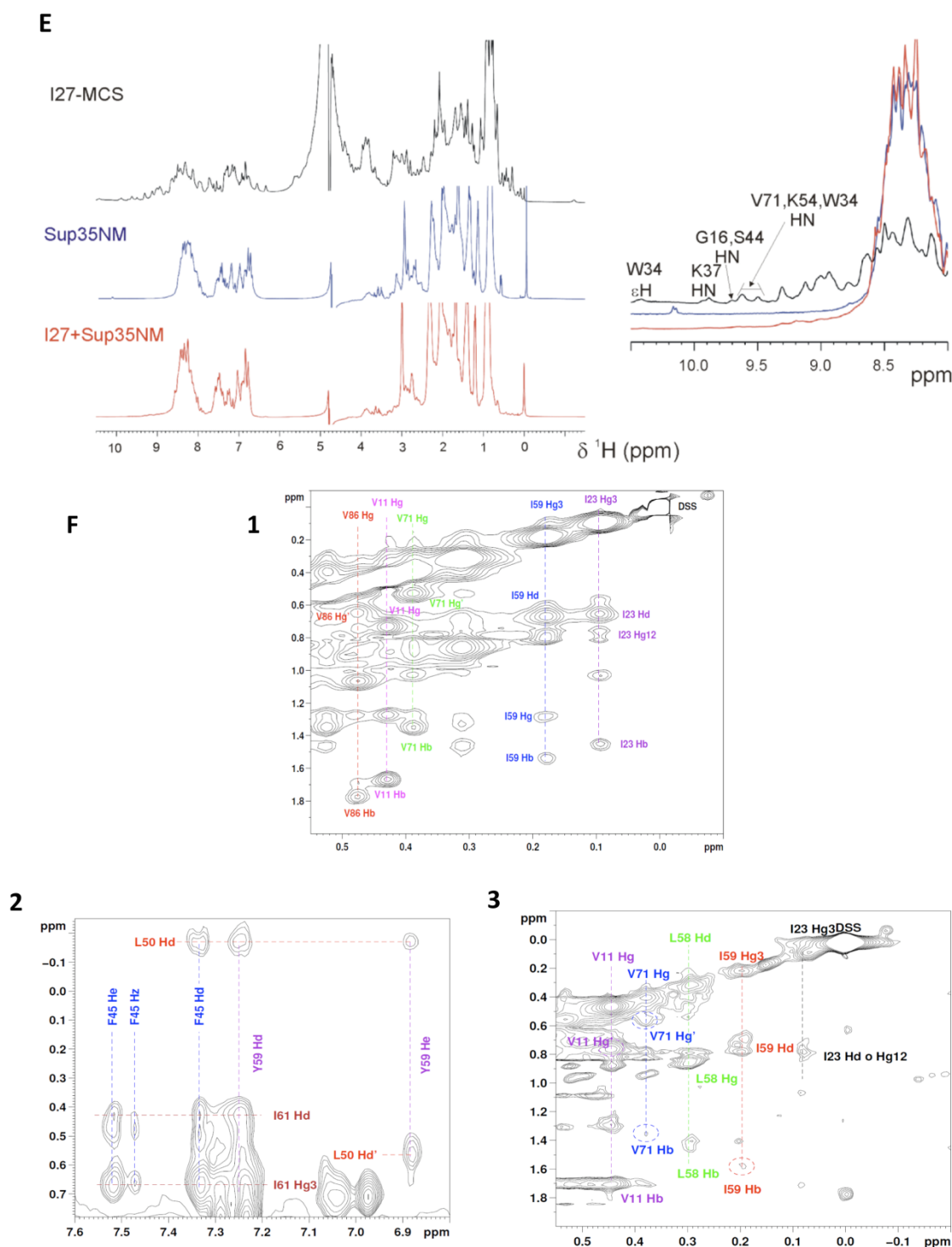


Figura 4-5. Análisis por NMR de las proteínas de fusión mínimas y proteínas aisladas. a) ^1H NMR de polyQs. Izquierda, espectros 1D completos; derecha, zoom de la región HN, donde se encuentran asignadas resonancias representativas de la fracción de I27 (Improta *et al.* 1996). El espectro de I27-MCS (parte superior) es muy similar al de I27 wt completamente plegado (Improta *et al.* 1996), y exhibe la típica extensa dispersión de desplazamientos químicos de proteínas plegadas. En las construcciones que contienen Q₁₉ (en el centro, rojo) o Q₃₅ (abajo, verde), el espectro de I27-MCS se mantiene. Dado que el desplazamiento químico ^1H es exquisitamente sensible al entorno local, estos datos indican que la estructura del esqueleto nativo de I27 se mantiene cuando Q₁₉ o Q₃₅ son insertados. A su vez, aparecen señales finas en las construcciones que contienen Q₁₉ o Q₃₅, que son asignadas a las resonancias del residuo de glutamina: HN del esqueleto, 8,4 ppm; cadena lateral H₂N, 7,50 y 6,84; H α , 4,3; H γ , 2,3; H β , 2,1, y H β' , 2,0 ppm, similares a valores de desplazamiento químico de referencia de Q en una

conformación RC (Wishart *et al.* 1995), indicando que los segmentos de polyQs permanecen desordenados cuando son insertados en I27. Los experimentos de CD y RMN no se llevaron a cabo para I27 + Q₆₂ debido a la dificultad de producir la proteína a la concentración requerida, aunque hay que señalar que I27 + Q₃₅ e I27 + Q₆₂ mostraron un comportamiento fibrillogénico comparable en TEM (véase **Fig. 4-9a**). **b)** ¹H NMR de VAMP2. El espectro de VAMP2 (centro, azul) muestra resonancias cuya anchura y valores de desplazamiento químico que, junto con la ausencia de señales (derecha), son características de un RC. Un ensanchamiento de la señal y retención de señales nativas similares al I27 se observó en el espectro de I27 + VAMP2 (parte inferior, rojo), lo que indica que I27 permanece plegado mientras que VAMP2 se encuentra desordenado en la construcción I27 + VAMP2. **c)** ¹H NMR de Aβ42. Las señales del I27 portador (superior, negro), son retenidas con variaciones muy pequeñas en las construcciones que llevan insertado el Aβ42 (rojo), Arc Aβ42 (verde) y F19S/L34P Aβ42 (parte inferior, rojo oscuro), indicando que el I27 portador conserva su estructura nativa plegada. Señales alrededor de 8.5-8.0, 7.3-7.0, y 0,9 ppm aumentan de tamaño en presencia de los portadores, de acuerdo con observaciones anteriores que son compatibles con hidrógenos amida, grupos aromáticos y grupos metilo de Aβ42, respectivamente, en una conformación predominantemente RC (Hou *et al.* 2004; Laurents *et al.* 2005). **d)** ¹H NMR de α-syn. El espectro ¹H NMR de A53T α-syn (azul) y ubi + A53T α-syn (rojo) son en gran medida comparables, excepto por cambios muy pequeños, principalmente a <1 y ~ 8 ppm. Esto indica que el comportamiento de A53T α-syn es similar cuando se encuentra aislada o insertada en ubi y no se producen interacciones fuertes entre las dos proteínas en la construcción portador + huésped. Además, los valores de desplazamiento químico de las resonancias en la región de campo alto en los espectros ¹H RMN para ubi + MCS (negro) y ubi + A53T α-syn (rojo) son muy similares. Esta similitud es una evidencia concluyente de que el núcleo hidrofóbico de ubi no se ve afectado por la presencia del huésped A53T α-syn. El ensanchamiento de las señales de ubi en el espectro que lleva el huésped A53T α-syn respecto a ubi + MCS es consistente con el mayor tamaño y movimiento de rotación más lento en la fusión de las dos proteínas (derecha). A53T α-syn carece de las señales de campo alto y su espectro ¹H completo es típico de una conformación RC. Los residuos asignados corresponden a la estructura plegada de ubi (Di Stefano y Wand 1987). **e)** ¹H NMR de Sup35NM. Espectros ¹H RMN de I27-MCS (negro), Sup35NM (azul) e I27 + Sup35NM (rojo) se muestran a la izquierda con una visión expandida de las resonancias HN a la derecha. El ensanchamiento de señales del espectro I27 + Sup35NM es más evidente que el observado para las otras proteínas huéspedes analizadas, probablemente debido a que es la inserción más grande analizada y/o por la formación de oligómeros y agregados, inferidos por CD en la **Figura 4-4e**. **f)** Para confirmar la preservación de estructura nativa de los módulos portadores ubi e I27 en las construcciones portador + huésped, se registraron espectros 2D ¹H NOESY para aquellos casos donde la estabilidad termodinámica del portador se encontraba más comprometida: I27 + VAMP2 (1), ubi + A53T α-syn (2) e I27 + Sup35NM (3). En todos los casos, las señales derivadas del empaquetamiento de grupos alifáticos y aromáticos del núcleo hidrofóbico nativo de ubi e I27 fueron observadas y asignadas rigurosamente, permitiéndonos concluir que la conformación nativa de los portadores se mantiene preservada cuando albergan IDPs en su interior.

Por tanto, a pesar de la disminución en estabilidad termodinámica del portador mostrada en la **Figura 4-3**, podemos concluir que los portadores mantienen inalterada su estructura terciaria global, en base a las medidas de CD en el UV lejano (**Fig. 4-4**) y los espectros 1D ¹H y 2D ¹H NOESY NMR (**Fig. 4-5**). Además, es importante destacar que la estabilidad mecánica del portador se conservó en algunas contrucciones, mientras que en otras se redujo notablemente (**Tabla 2**).

| Portador | Huésped | n | F _u (x ± SD) (pN) |
|----------|------------------------|-------------|------------------------------|
| I27 | Q ₁₉ | NM (n= 111) | 149 ± 62 |
| | Q ₃₅ | NM (n= 95) | 156 ± 51 |
| | | M (n= 5) | 180 ± 11 |
| | Q ₆₂ | NM (n= 99) | 200 ± 36 |
| | | M (n= 8) | 212 ± 36 |
| | Q ₆₂ + QBP1 | NM (n= 120) | 169 ± 89 |
| | | M (n= 4) | 137 ± 10 |

| | | | |
|-----|---------------------------|------------|---------------|
| | A β 42 | NM (n= 78) | 128 \pm 64 |
| | | M (n= 38) | 125 \pm 76 |
| | Arc A β 42 | NM (n=39) | 119 \pm 69 |
| | | M (n=63) | 116 \pm 96 |
| | Arc A β 42 + QBP1 | NM (n=46) | 128 \pm 51 |
| | | M (n=62) | 110 \pm 71 |
| | A β 42 + SV111 | NM (n=89) | 133 \pm 77 |
| | | M (n=39) | 156 \pm 78 |
| | F19S/L34P A β 42 | NM (n=396) | 174 \pm 43 |
| | Sup35NM | NM (n=37) | 146 \pm 30 |
| | | M (n=62) | 141 \pm 79 |
| | Sup35NM + QBP1 | NM (n=73) | 125 \pm 78 |
| | | M (n=27) | 122 \pm 61 |
| ubi | VAMP2 | NM (n=188) | 152 \pm 50 |
| | VAMP2 | NM (n=234) | 149 \pm 48 |
| | α -syn | NM (n=54) | 149 \pm 115 |
| | | M (n=44) | 155 \pm 35 |
| | A30P α -syn | NM (n=41) | 161 \pm 90 |
| | | M (n=51) | 115 \pm 91 |
| | A53T α -syn | NM (n=38) | 117 \pm 67 |
| | | M (n=58) | 121 \pm 94 |
| | A53T α -syn + QBP1 | NM (n=224) | 182 \pm 56 |
| | | M (n=35) | 187 \pm 98 |

Tabla 2. Estabilidad mecánica (F_u) de las proteínas portadoras tras la inserción de la proteína huésped. El valor de F_u de los portadores indica una disminución significativa en la estabilidad mecánica de los mismos tras la inserción de las distintas proteínas huéspedes (adoptando tanto conformaciones NM como M), en comparación con los portadores nativos sin modificar (204 \pm 26 pN para I27 (Carrión-Vázquez *et al.* 1999) y 203 \pm 35 para ubi (Carrión-Vázquez *et al.* 2003), para una velocidad de estiramiento similar a la utilizada en nuestros experimentos. Esto indica que la proteína huésped afecta ligeramente a la estabilidad mecánica de los portadores. Considerando que los criterios para la selección de registros de SMFS implica la observación del pico de fuerza correspondiente al desplegamiento del módulo portador, podemos concluir que el tamaño muestral que presentamos podría estar infra-estimado. SD: desviación estándar.

La capacidad de las proteínas de fusión mínimas generadas tanto para **agregar, como para adquirir estructura β con el tiempo**, ambas características propias de las NPs, fue testado mediante diferentes aproximaciones:

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis **mediante CD** para estimar cambios en el contenido de estructura β tras la incubación de las diferentes muestras a 37°C a diferentes tiempos (0, 2, 5, y 7 días), obteniendo como resultado el siguiente comportamiento (**Fig. 4-4**, derecha); A día 0 las NPs se comportan fundamentalmente como un RC y con el tiempo incrementan su contenido de estructura β . QBP1 es capaz de reducir la adquisición de dicha estructura en todas ellas, a excepción de A β 42. Su agregación, sin embargo, resultó inhibida tanto por el péptido SV111, tal y como se describió anteriormente (Arslan *et al.* 2010), como por una doble mutación que lo convierte en un péptido anti-amiloidogénico (Wurth *et al.* 2002). Por otro lado, α -syn, tanto sola como fusionada a la proteína portadora, mostró estructura α -

helicoidal en presencia de micelas de SDS (**Fig 4-4d**, izquierda), mimetizando el comportamiento natural de α -syn al interactuar con la membrana celular (Ulmer *et al.* 2005).

Actualmente, la agregación de las NPs insertadas en el portador fue monitorizada indirectamente por **análisis de turbidez** a 405 nm (**Fig. 4-6**) y más específicamente, la formación de componente amiloide fue cuantificada mediante ensayos de **unión al colorante Rojo Congo**, confirmando que la agregación observada en pruebas turbimétricas era fundamentalmente amiloidogénica (**Fig. 4-7**, izquierda). Los agregados amiloides unidos al colorante Rojo Congo mostraron la fluorescencia típica bajo un microscopio óptico invertido **Leica DMI6000B** (Leica Microsystems, **Fig. 4-7**, derecha) y la típica birrefringencia verde-naranja bajo un **microscopio de luz polarizada** (no mostrado).

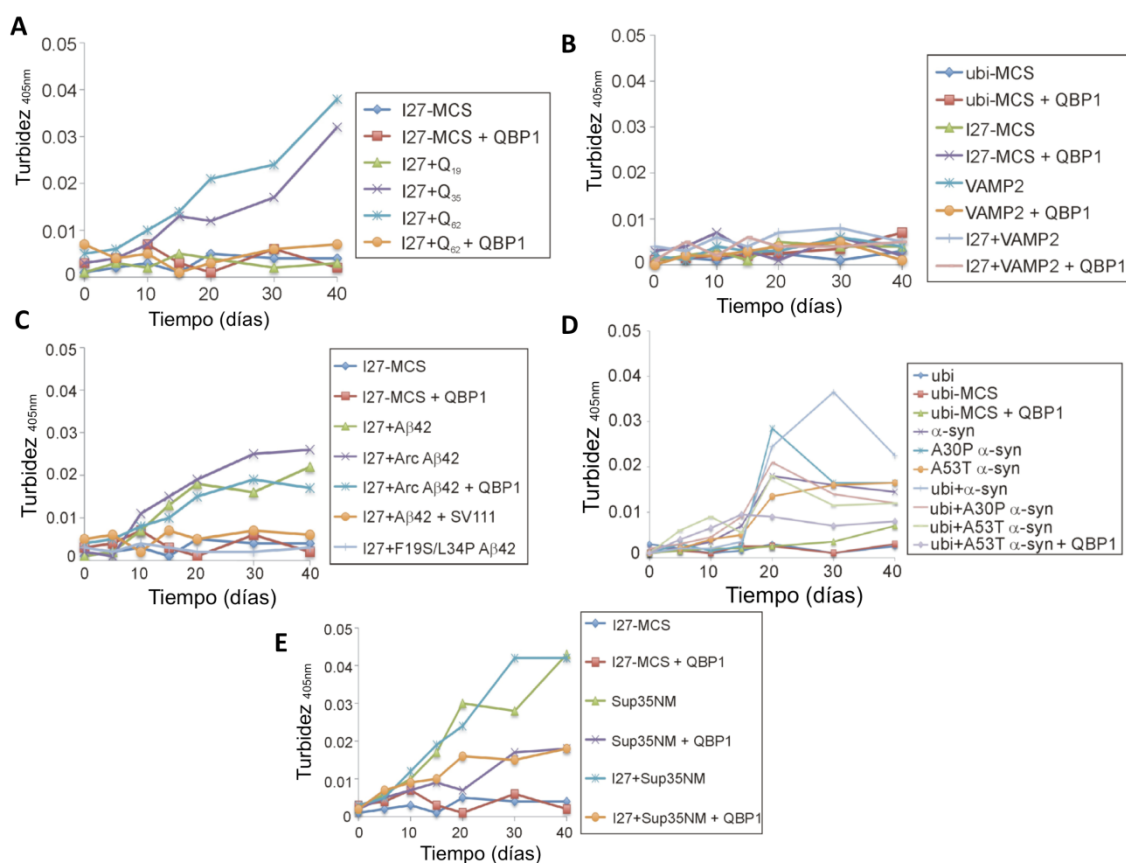


Figura 4-6. Análisis por turbidimetría de las proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas. **a)** Agregación de muestras de polyQs monitorizado por turbidimetría a 405 nm durante el período de incubación indicado a 37°C. Sólo las muestras de I27 + Q₃₅ e I27 + Q₆₂ mostraron agregación. QBP1 inhibió la capacidad de agregar de ambas, como fue descrito anteriormente para thio-Q₆₂ (Nagai *et al.* 2000). **b)** Como era de esperar dada su naturaleza no amiloidogénica, VAMP2 no agregó bajo ninguna de las condiciones estudiadas (Hazzard *et al.* 1999). **c)** Agregación de I27 + A β 42 (wt y variantes) durante el período de incubación indicado a 37°C. La presencia de QBP1 no afectó la agregación de A β 42. Por el contrario, el péptido SV111 inhibió la agregación de I27 + A β 42, como se demostró anteriormente para A β 42 aislado (Arslan *et al.* 2010). F19S/L34P A β 42 contiene dos mutaciones puntuales que impiden la

agregación de A β 42 (Wurth *et al.* 2002) y por consiguiente, no agregó en nuestras condiciones experimentales. **d)** Agregación de α -syn seguida por turbidimetría a 405 nm. Las diferentes α -syn (wt y mutantes, aisladas o insertadas en ubi) agregaron, mientras que el módulo portador aislado no lo hizo. QBP1 redujo la agregación de ubi + A53T α -syn, aunque en menor grado que en I27 + Q₆₂. **e)** Las muestras de Sup35NM, ya sea aislado o insertado en el I27 portador, agregaron en el período de tiempo indicado durante la incubación a 37°C. La presencia de QBP1 redujo la agregación de Sup35NM.

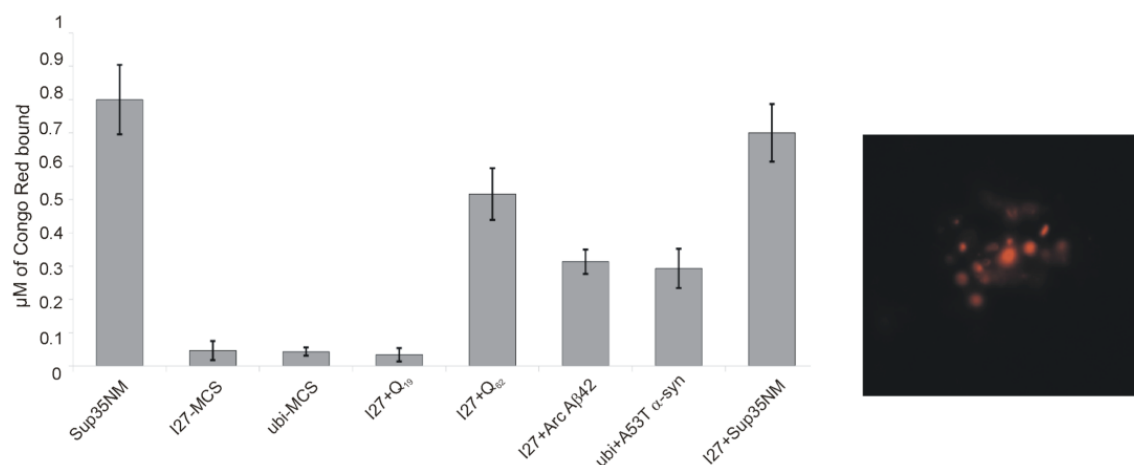


Figura 4-7. Ensayo de unión de Rojo Congo. Concentración (μ M) del colorante Rojo Congo unido a los agregados amiloides formados por las NPs (panel superior), calculada a través del efecto batocrómico / hipercrómico observado en los espectros de absorción tras la unión específica del colorante a los agregados amiloides formados (Wurth *et al.* 2002). Sup35NM aislado se utilizó como control positivo y los portadores aislados como controles negativos. A la derecha se muestra una micrografía óptica de fluorescencia tomada con un objetivo 63 \times donde se muestran agregados amiloides formados por I27 + Sup35NM unidos a Rojo Congo.

En el caso concreto de α -syn, tanto en la forma wt como en los mutantes A30P y A53T, el proceso de agregación/oligomerización también fue monitorizado a diferentes tiempos mediante **PAGE en condiciones nativas**. En este análisis se aprecia que a día 0 las muestras empezaron mayoritariamente como forma monomérica y con el paso del tiempo se fueron formando agregados de alto peso molecular (**Fig. 4-8**).

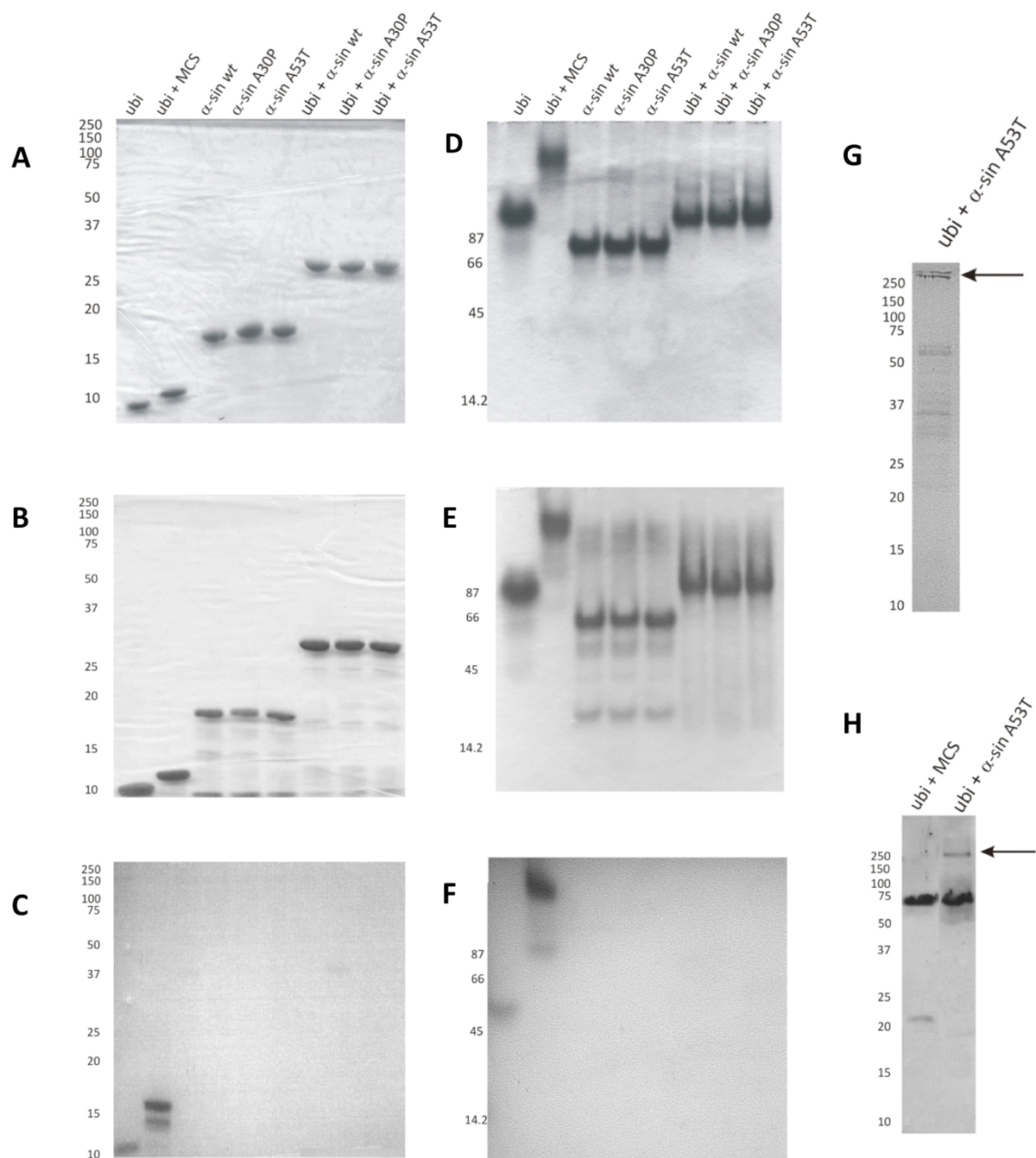
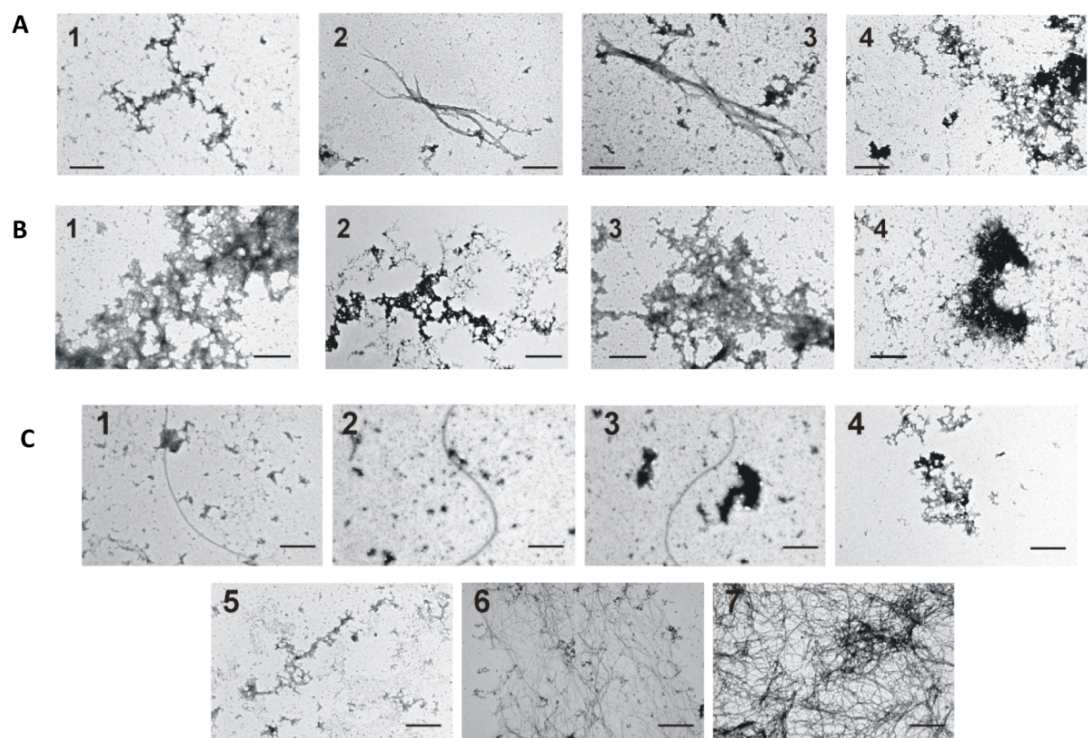


Figura 4-8. Propiedades electroforéticas de los agregados de α -syn. **a)** Tinción de azul de Coomassie de un gel SDS-PAGE al 15% de las proteínas recombinantes purificadas. Los tamaños nominales en kDa según ProtParam son: ubi: 11, ubi + MCS: 12, α -syn: 17, ubi + α -syn: 27. **b)** SDS-PAGE (desnaturalizante) al 15 % de las muestras incubadas durante 7 días a 37°C, en el que se aprecia cierta degradación proteolítica generalizada. **c)** SDS-PAGE al 15 % de las muestras incubadas durante 50 días. Las muestras agregadas presentaron un patrón de migración de bandas de alto peso molecular (muy tenues, por lo que apenas se aprecian en la imagen). **d)** Tinción de azul de Coomassie de un gel en condiciones nativas al 10% de las proteínas antes de su incubación a 37°C. Se observó una sola banda para cada proteína, indicando que están constituidas por una única especie. **e)** PAGE (nativo) al 10 % de las muestras tras 7 días de incubación. En las α -syn (aisladas en insertadas en ubi) se aprecia aparición de bandas de alto peso molecular cuando es comparado con el panel d. **f)** PAGE al 10 % de las muestras tras 50 días de incubación. Las muestras agregadas no pudieron penetrar en la matriz del gel. **g)** SDS-PAGE al 15 % de ubi+ α -syn A53T incubada durante 50 días. La carga presentada aquí es 40 veces mayor que en el panel f. Se detectaron bandas de alto peso molecular con una fracción importante de agregados que no penetran en el gel de separación (indicados por la flecha). **h)** Western-blot con marcaje con el anticuerpo A11 (anti-oligómero amiloide). El anticuerpo marca específicamente una banda que no penetró en el gel de

separación en ubi + A53T α -syn, pero no en ubi + MCS (flecha). Esa banda corresponde con la banda marcada por la flecha en el panel g. Se desconoce el origen del resto de bandas de marcaje inespecífico del anticuerpo (de aproximadamente 75 y 22 kDa). Salvo en el caso del *Western-blot*, el resto de imágenes corresponden con tinciones de azul de Coomassie.

Además, la formación de fibras amiloides de las proteínas de fusión mínimas generadas fue monitorizada mediante adquisición de imágenes por iAFM y TEM (**Fig. 4-9**). Para comparar la capacidad de fibrilar de estas construcciones con proteínas aisladas sin módulo portador, se realizaron medidas a los mismos tiempos y concentraciones para A53T α -syn y Sup35NM, no apreciándose diferencias claras entre la versión aislada y la versión con portador (**Fig. 4-9d,e**). Finalmente, como control adicional, se adquirieron imágenes de TEM para una de las poliproteínas completas usadas en los ensayos de SMFS (pFS-2 + Sup35NM), construcción que mostró también capacidad para fibrilar, aunque en menor medida que para I27 + Sup35NM o Sup35NM aislado (**Fig. 4-9e**).



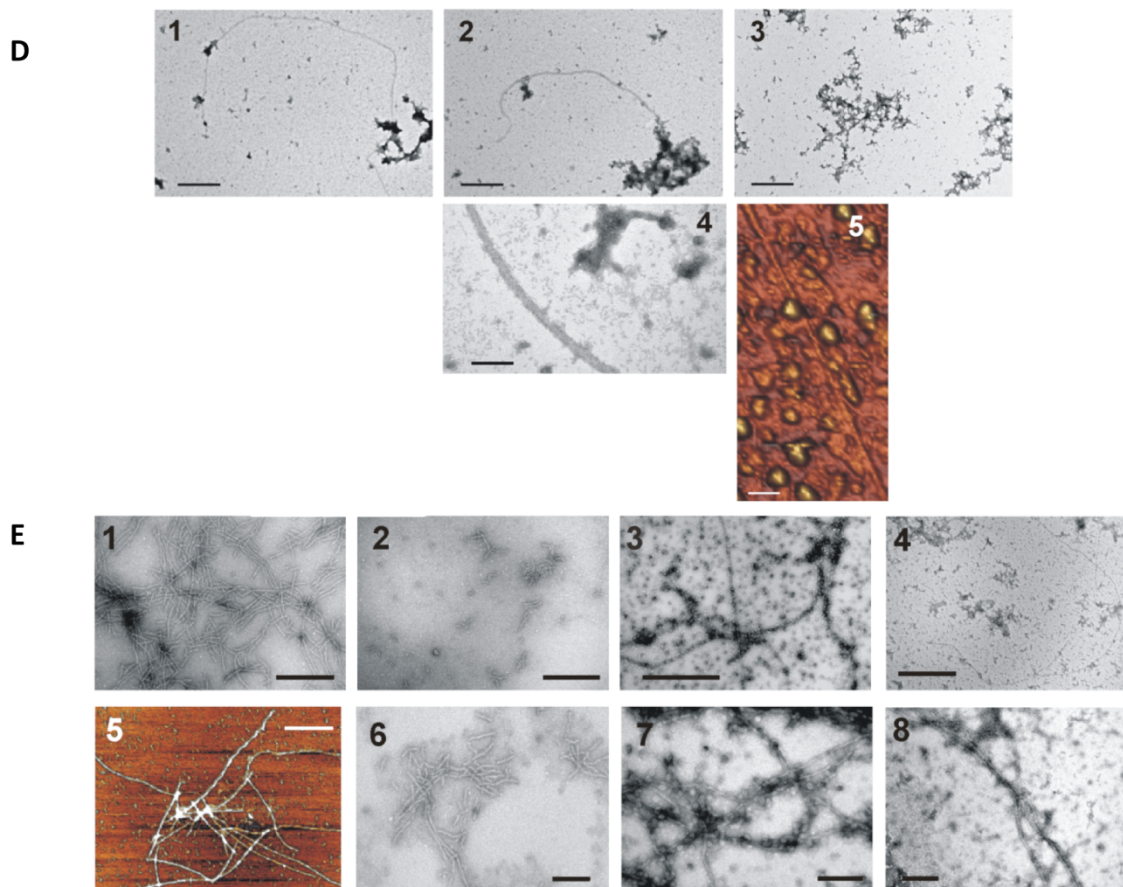
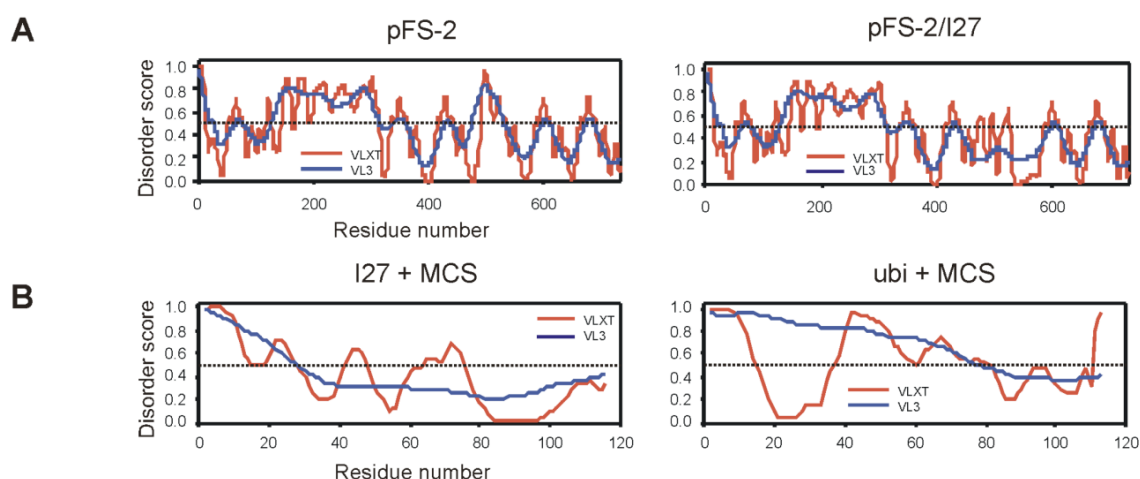


Figura 4-9. Análisis por TEM e iAFM de las proteínas de fusión mínimas y proteínas aisladas. a) Imágenes de TEM de I27 + Q₁₉ (1), I27 + Q₃₅ (2), I27 + Q₆₂ (3) e I27 + Q₆₂ + QBP1 (4) después de una incubación de 32 días a 37°C. La concentración de proteína usada fue 12 μ M mientras que la de QBP1 fue 20 μ M. No se observaron fibras amiloides en I27 + Q₁₉ e I27 + Q₆₂ + QBP1. Las imágenes se tomaron a 30.000 \times (paneles 1 y 4) y 60.000 \times (paneles 2, 3). Las barras de escala corresponden a 0,6 (paneles 1, 4) y 0,3 μ m (paneles 2, 3). **b)** Imágenes de TEM de las muestras I27-MCS (1), ubi-MCS (2), VAMP2 (3), e I27 + VAMP2 (4), utilizados como controles negativos de fibrillogénesis después de una incubación de 30 días a 37°C. La concentración de proteína usada fue 40 μ M. Ninguna de estas muestras formaron fibras amiloides sino masas de agregados amorfos. Las imágenes se adquirieron a 30.000 \times y las barras de escala corresponden a 0,6 μ m. **c)** Imágenes de TEM de I27 + A β 42 (1), I27 + Arc A β 42 (2), I27 + Arc A β 42 QBP1 (3), I27 + A β 42 + SV111 (4), I27 + F19S/L34P A β 42 (5), A β 42 (6) y A β 42 + QBP1 (7) después de 32 días de incubación a 37°C, excepto para 6 y 7, cuyas imágenes se tomaron después de 13 días de incubación. Las concentraciones de proteína, QBP1 y SV111 fueron 10, 20, y 100 μ M, respectivamente, a excepción de las imágenes 6 y 7, donde la concentración de la proteína A β 42 asilada corresponde a 50 μ M, mientras que la concentración de QBP1 (7) fue de 500 μ M. Estas observaciones reflejan fielmente los resultados esperados. No se observaron fibras amiloides en presencia de SV111 o para F19S/L34P A β 42, mientras que QBP1 no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de amiloidogénica de A β 42 (incluso a altas concentraciones). Las imágenes se adquirieron a 30.000 \times (1, 4), 50.000 \times (2), 40.000 \times (3), 20.000 \times (5-7). Las barras de escala corresponden a 0,6 (1, 4), 0,35 (2), 0,45 (3), y 0,9 μ m (5-7). **d)** 1-4: Imágenes de TEM de α -syn (1), ubi + A53T α -syn (2, 4), y ubi + A53T α -syn + QBP1 (3) después de 22 días de incubación a 37°C. Las fibras amiloides observadas para A53T α -syn y ubi + A53T α -syn resultaron comparables. La concentración de proteína usada fue 10 μ M y la concentración de QBP1 fue 20 μ M. No se observaron fibras para ubi + A53T α -syn + QBP1. Las imágenes se adquirieron a 60.000 \times (1), 40.000 \times (2), 30.000 \times (3), y 120.000 \times (4). Las barras de escala corresponden a 0,3, 0,45, 0,6, y 0,15 μ m, respectivamente. 5: imagen de iAFM en líquido de ubi + A53T α -syn tras de 52 días de incubación a 37°C, adquiridas utilizando el modo dinámico de imagen como se describe en Valbuena *et al.* 2007. La barra de escala corresponde a 50 nm. **e)** Imágenes de TEM de Sup35NM (1), Sup35NM + QBP1 (2), I27 + Sup35NM (3), I27 + Sup35NM +

QBP1 (4), Sup35NM 4°C (6), I27 + Sup35NM 4°C (7) y pFS-2 + Sup35NM (8). Las imágenes de los paneles 1-4 fueron observadas después de una incubación de las muestras de 32 días a 37°C, mientras que las muestras para los paneles 6-8 fueron incubadas durante 29 días a 4°C. Las concentraciones de la poliproteína pFS-2 + Sup35NM, I27 + Sup35NM, Sup35NM y QBP1 fueron 20, 10, 10, y 20 μ M, respectivamente. La presencia de fibras amiloides y oligómeros se redujo en presencia del péptido QBP1, tanto en Sup35NM (2) como en I27 + Sup35NM (4). La formación de fibras amiloides y oligómeros se redujo a 4°C (paneles 6 y 7, temperatura utilizada para el almacenamiento de proteínas antes, y entre sesiones de experimentos de SMFS). Aunque todavía visibles, el número de fibras formadas por pFS-2 + Sup35NM (8) fue considerablemente inferior a Sup35NM (6) o I27 + Sup35NM (7) bajo las mismas condiciones. Las imágenes de TEM se tomaron a 60.000 \times (1, 2), 40.000 \times (3), 30.000 \times (4), 100.000 \times (6), 120.000 \times (7), y 80.000 \times (8). La imagen de iAFM (5) se realizó usando el modo dinámico de imagen en medio líquido como se describe en Valbuena *et al.* 2007. Las barras de escala corresponden a 0,3 (1, 2), 0,45 (3), 0,6 (4), 0,5 (5), 0,18 (6), 0,15 (7), y 0,22 (8) μ m.

Por último, como prueba adicional tanto de la integridad del plegamiento de la proteína portadora como de la naturaleza inicial desordenada de las proteínas huéspedes, sus secuencias fueron analizadas por **algoritmos computacionales de predicción de orden/desorden**, PONDR (**Fig 4-10**). Las predicciones de desorden se realizaron tanto para las secuencias de NPs aisladas como para las secuencias de proteínas de fusión mínima, resultando comparables. Este análisis proporciona una prueba más de que la estrategia portador + huésped no causa alteraciones estructurales importantes ni en el portador ni en la IDP insertada y están en línea con el comportamiento observado por SMFS para las construcciones que contienen α -syn, A β 42 y Sup35NM. Para estas tres proteínas fueron predichas regiones con tendencia a formar una estructura residual significativa, mientras que VAMP2 casi no mostró regiones con esta tendencia. En contraste, los trectos de polyQs mostraron valores que indican que son altamente desordenados en todas las construcciones, independientemente de la longitud de la polyQ. No obstante, hay que señalar que experimentalmente este homopolímero tiende a adoptar una conformación muy debido a su baja solubilidad en agua (Vitalis *et al.* 2008).



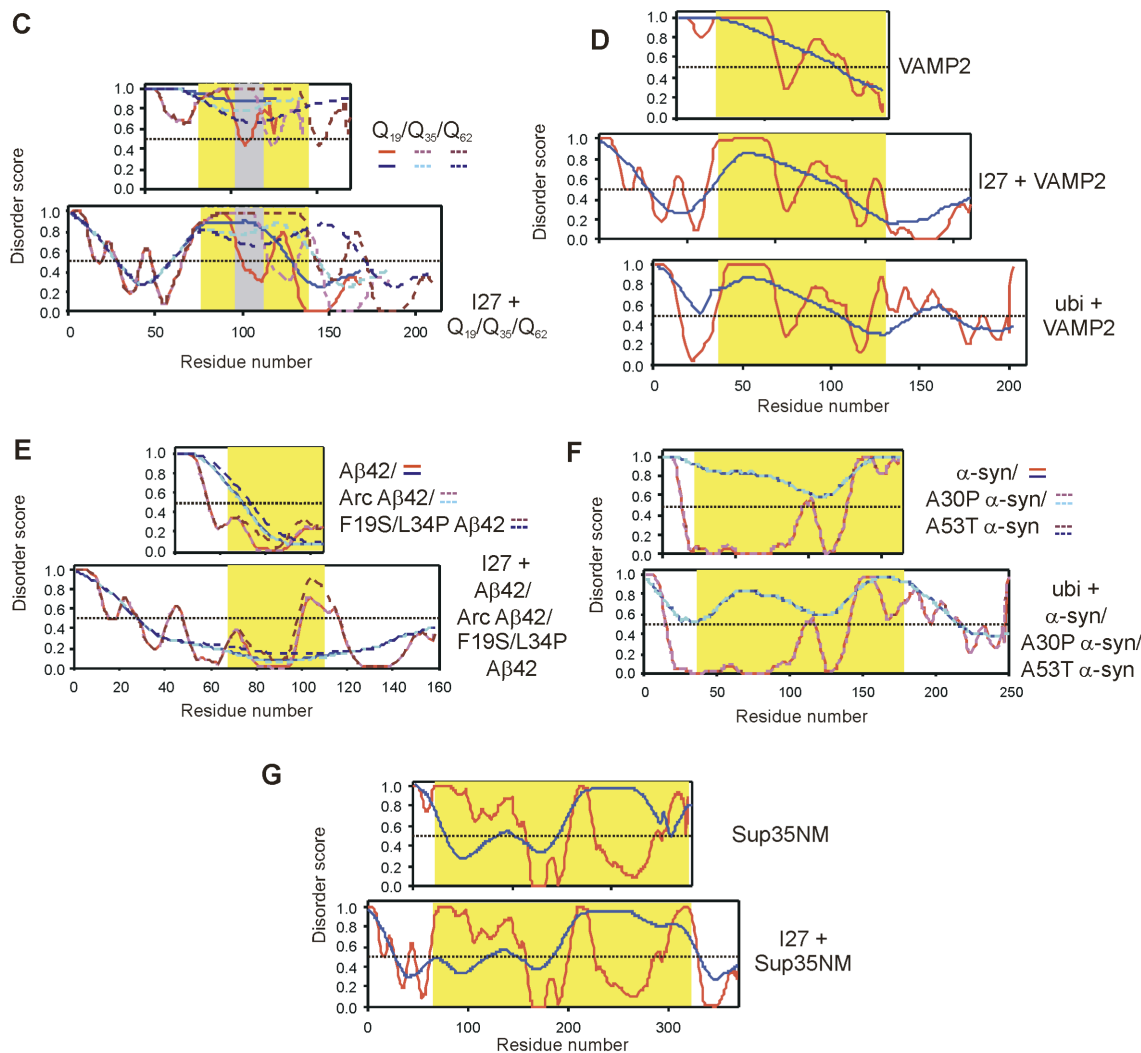


Figura 4-10. Predicciones intrínsecas de desorden para las poliproteínas/proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas utilizadas. Valores de PONDRL por debajo de 0,5 indican una tendencia a formar estructuras ordenadas, mientras que mayores de 0,5 indican una tendencia para el desorden. Los datos de PONDRL VLXT y PONDRL VL3 se muestran como una línea roja y azul, respectivamente. **a)** pFS-2 (izquierda) y pFS-2/I27 (I27 como la proteína portadora, a la derecha): estas predicciones muestran una correlación razonable con los diferentes módulos de la poliproteína pFS-2, donde la región desordenada corresponde al tramo de N2B, mientras las regiones ordenadas corresponden a las repeticiones I27/ubi (Oroz *et al.* 2012). **b)** I27-MCS (izquierda) y ubi-MCS (derecha). **c-g)** NPs/VAMP2 aisladas (arriba) y las construcciones portador + huésped (abajo), tal como se indica en la figura. Las secuencias correspondientes a los huéspedes se encuentran sombreadas de color amarillo. Las escalas para predicciones de los huéspedes y de construcciones portador + huésped se normalizaron de manera que la región de interés presenta la misma longitud en ambos gráficos. Los extremos de las regiones que comparten secuencias comunes se encuentran en la misma posición x para facilitar la comparación de datos de huéspedes con construcciones portador + huésped. Dado que Q₃₅ y Q₆₂ comienzan en la misma posición en ambas construcciones ([c] superior e inferior) pero presentan diferentes longitudes, el sombreado correspondiente a la NP empieza en la misma posición, pero se extiende de manera diferente. El primer área sombreada de color amarillo corresponde a Q₁₉ mientras que Q₃₅ se extiende hasta el final de la región sombreada en gris y Q₆₂ hasta el final de la segunda zona sombreada de color amarillo. La región no sombreada en los gráficos de los huéspedes corresponde a residuos que no pertenecen a la secuencia de huésped, es decir, etiquetas de purificación o residuos añadidos en expansiones de polyQs que provienen del vector usado (Nagai *et al.* 2000). PONDRL VLXT y VL3 utilizan diferentes tamaños de ventana y son entrenados en bases de datos muy diferentes. Como resultado, sus

predicciones difieren considerablemente, especialmente para las NPs más largas ([f] α -syn y [g] Sup35NM). Sin embargo, todas las NPs (excepto trectos de polyQs) contienen segmentos con tendencia a ser estructurados, de acuerdo con nuestros resultados de SMFS. Las regiones estructuradas predichas por el análisis computacional deben ser pequeñas y fluctuantes para que este análisis sea compatible con el comportamiento RC predominante observado mediante CD/NMR (Figs. 4-4 y 4-5).

Todos los **controles estructurales y de agregación/fibrillogénesis** mostrados en esta sección se resumen en la **Tabla 3**.

| Proteína | | Test de agregación (Turbidimetría / Rojo Congo) | Análisis estructural (CD / NMR) | Fibrillogénesis (TEM / iAFM) |
|---------------|------------------------|--|------------------------------------|---------------------------------|
| PolyQ | Q ₁₉ | - / - | +/+ | -/ND (- con QBP1) |
| | Q ₃₅ | +/ND | +/+ | +/ND (- con QBP1) |
| | Q ₆₂ | -QBP1 | ND/ND | +/ND |
| | | +QBP1 | ND/ND | -/ND |
| VAMP2 | I27-VAMP2 | -/ND | +/+ | -/ND |
| | Ubi-VAMP2 | -/ND | +/+ | -/ND |
| A β | A β 42 | -SV111 | +/ND | +/+ |
| | | +SV111 | -/ND | +/ND |
| | Arc A β 42 | -QBP1 | +/+ | +/ND |
| | | +QBP1 | +/ND | +/ND |
| | F19S/L34P A β 42 | -/ND | +/+ | -/ND |
| α -syn | wt | +/ND | +/+ | +/ND |
| | A30P | +/ND | +/+ | +/ND |
| | A53T | -QBP1 | +/+ | +/+ |
| | | +QBP1 | +/ND (reducido) | +/ND |
| Sup35NM | -QBP1 | +/+ | +/+ | +/+ (+ en pFS-2) |
| | +QBP1 | +/ND (reducido) | +/ND | +/ND (muy reducido) |

Tabla 3. Resumen de controles estructurales, de agregación y fibrillogénesis. Los experimentos fueron llevados a cabo con las proteínas de fusión mínima (portador + huésped, a menos que se indique lo contrario). ND: no determinado; +, resultado positivo, -, resultado negativo. Las abreviaturas para las técnicas se introducen en el texto principal. QBP1 y SV111 son inhibidores introducidos y mencionados en el texto.

Polimorfismo conformacional de NPs

La técnica de MMI usada para analizar la nanomecánica de las NPs seleccionadas, expresadas como poliproteínas de fusión en el vector pFS-2, fue el **AFM-SMFS en el modo de "length-clamp"** (ver **Sección 1.3.2.1.2**). Mediante esta modalidad de SMFS se pueden obtener dos parámetros básicos de manera directa: la **estabilidad mecánica** de las barreras de resistencia al desplegamiento (F_u , medida directamente por la altura de los picos de fuerza en una curva fuerza-extensión), y el **aumento de la longitud de contorno** tras el desplegamiento, ΔL_c , medida tras el ajuste del espectro de fuerza-extensión al modelo de elasticidad de polímeros WLC (ver **Sección 1.3.2.2**). Usando este modo de SMFS, y basándonos en la estrategia de la proteína hospedadora como característica del vector pFS-2, hemos seguido unos criterios muy estrictos a la hora de seleccionar curvas que corresponden a moléculas

individuales, descritos en la sección de **Materiales y Métodos**. En resumen, se seleccionaron únicamente aquellos registros en los que el ΔL_c del portador era seguido, no necesariamente de forma consecutiva, por picos de fuerza cuyos valores de ΔL_c sumasen la longitud total esperada para la proteína de fusión portador + huésped (**Fig. 4-11**).

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, la estrategia de la proteína portadora basada en el vector pFS-2, es la primera estrategia que permite descartar con éxito datos de SMFS contaminados por interacciones inespecíficas en la región proximal, siendo particularmente útil para el análisis de IDPs (Oroz *et al.* 2012), de forma que nos garantiza que los datos seleccionados provienen del estiramiento de moléculas individuales de NPs (**Fig. 4-11**). Sin embargo en SMFS, el estirar un monómero de NP individual en dirección N-C terminal no excluye, en principio, posibles interacciones de la NP con el portador, con diferentes elementos del AFM (sustrato o punta) o con otras NPs circundantes (interacciones intermoleculares necesarias para la formación de oligómeros y/o fibras). Dado que estamos interesados en la **caracterización del polimorfismo conformacional de monómero**, este tipo de interacciones indeseadas, que constituyen la tercera limitación de los estudios mencionados anteriormente, deben ser descartadas para poder atribuir de forma inequívoca los eventos de fuerza a la ruptura de interacciones intramoleculares que mantienen las estructuras transitorias formadas por monómeros de NPs. Mediante el uso de controles específicos, en esta tesis se aportan resultados que muestran que bajo las condiciones experimentales testadas, los datos, rigurosamente seleccionados, provienen del estiramiento de monómeros de NP y representan *bona fide* interacciones intramoleculares, como se discutirá más adelante. Por último, gracias a la restricción de los grados de libertad de las NPs insertadas, el uso del vector pFS-2 presenta la ventaja adicional de ralentizar drásticamente la fibrillogénesis (**Fig. 4-9e**), minimizando de este modo la formación de agregados (interacciones intermoleculares) durante el análisis nanomecánico de las NPs.

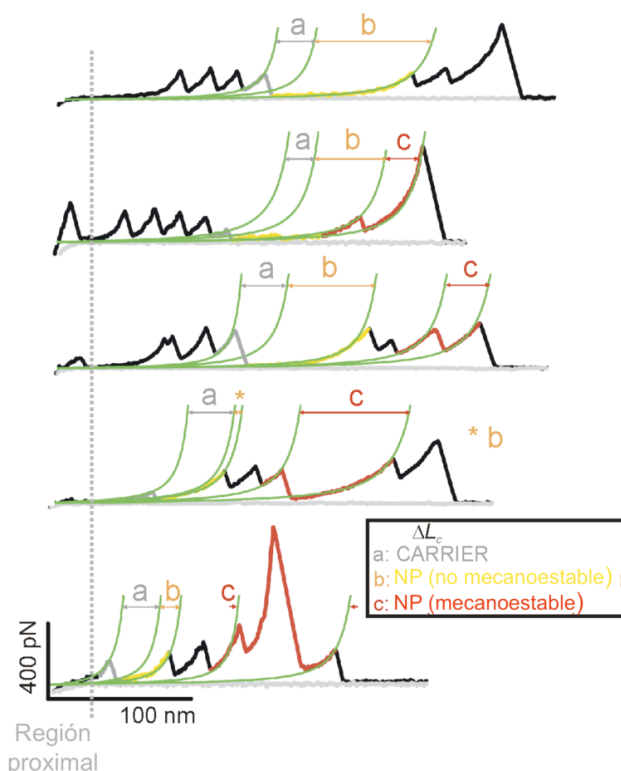


Figura 4-11. Análisis nanomecánico de NPs mediante la estrategia “portador-huésped” basada en pFS-2.

En esta figura se presentan varios espectros fuerza-extensión representativos de la construcción pFS-2 + Sup35NM. Utilizando esta estrategia, podemos resolver de manera fiable una amplia variedad de conformaciones adoptadas por Sup35NM, que van desde una conformación no mecanoestable (NM, curva superior, en color naranja), a conformaciones mecanoestables con diferentes grados de estabilidad mecánica (M, en rojo), incluidos conformeros hiper-mecanoestables (hM, abajo). El código de colores se mantendrá durante el resto del texto. En base a nuestro diseño, el módulo portador debe desplegarse completamente (siendo “a” el ΔL_c para el módulo portador) antes que la fuerza pueda

acceder al interior y estirar la proteína huésped ("b" y "c" representan el ΔL_c para las regiones NM y M de la NP, respectivamente). La suma b+c corresponde con la longitud total de la NP totalmente estirada. El vector pFS-2 también contiene una región que no ofrece resistencia al estiramiento (una parte del fragmento desordenado de titina N2B), que puede actuar a modo de espaciador para alejarnos de la región proximal ruidosa de los espectros fuerza-extensión, un problema típico en los experimentos de SMFS (Oroz *et al.* 2012)).

Las **enfermedades causadas por expansiones de polyQs** son únicas entre las **enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas** ya que están determinadas genéticamente y además, sus NPs (polyQs expandidas) muestran umbrales patológicos de número de Qs; 21-30 ó 36-40 Qs en la ataxia espinocerebelosa tipo 6 -SCA6- o en la enfermedad de Huntington y resto de enfermedades causadas por polyQs, respectivamente. Curiosamente, existe una correlación positiva entre el número de repeticiones de Qs con la gravedad y edad de inicio de la enfermedad, así como con la cinética de oligomerización (Bates 1996). Por tanto, asumiendo una hipótesis simple, podemos pensar que los determinantes moleculares de esta enfermedad se correlacionen con el número de residuos de Qs. Mediante nuestro análisis hemos buscado posibles diferencias mecánicas en trectos de polyQs de tres longitudes diferentes; por debajo, cerca de (excepto para SCA6) y por encima del umbral de patogenicidad de las enfermedades causadas por polyQs: Q₁₉, Q₃₅ y Q₆₂ (**Fig. 4-12a**).

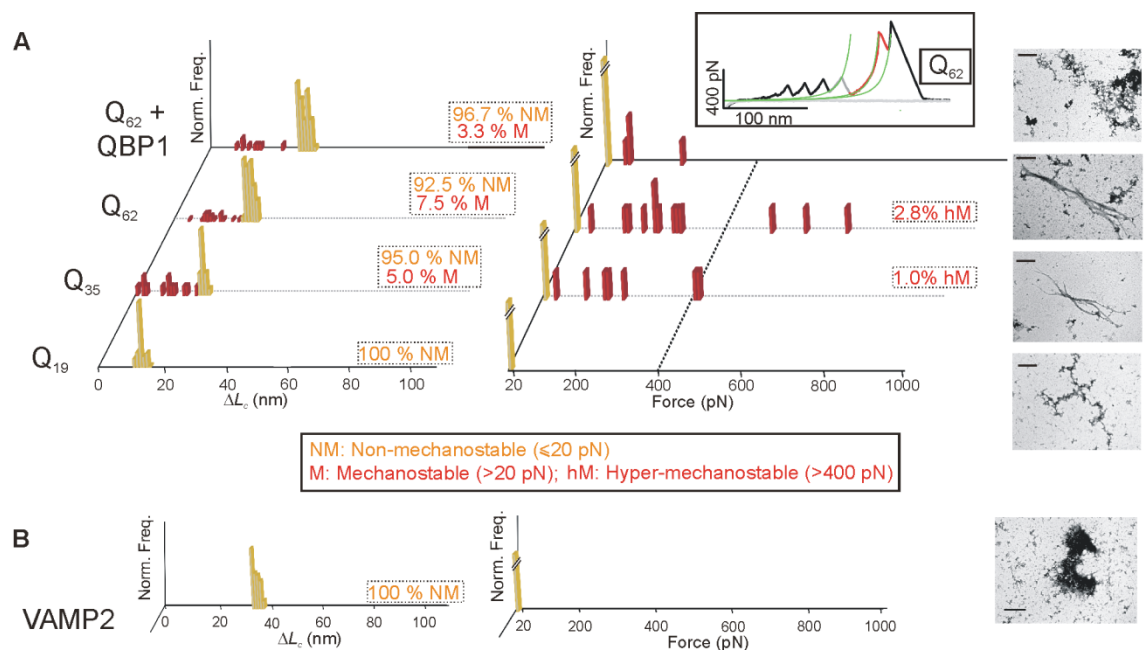
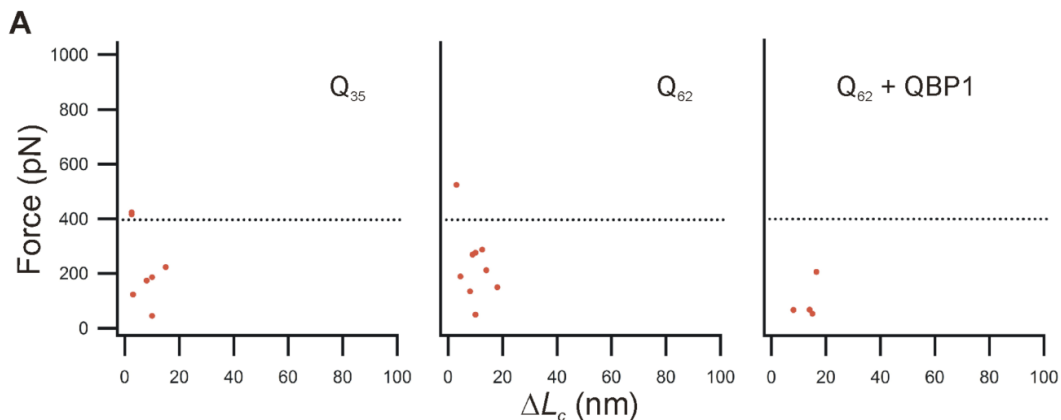


Figura 4-12. Análisis nanomecánico de diferentes trectos de polyQs y una IDP no amiloidogénica (VAMP2). a) Histogramas de ΔL_c (izquierda) y F_u (derecha) para poliproteínas pFS-2 que llevan diferentes trectos de polyQs. La construcción que lleva el tracto sub-umbral Q₁₉ (primera fila) sólo muestra confórmeros NM (barras naranjas, representados en los histogramas de F_u por debajo de la sensibilidad de nuestro AFM: $F \sim 20$ pN). Una forma cercana al umbral patológico para la enfermedad de Huntington y un mutante expandido (Q₃₅ y Q₆₂, respectivamente) exhiben un polimorfismo conformacional que oscila entre confórmeros NM y confórmeros M (barras rojas) e incluye algunos confórmeros hM ($F_u \geq 400$ pN). Cabe señalar que cuanto más largo es el tracto de polyQ, mayor es el polimorfismo conformacional y mayor número de confórmeros hM son encontrados. El inhibidor QBP1 a una concentración de 20 μ M (Tomita *et al.* 2009), reduce este polimorfismo y suprime los confórmeros hM. El recuadro muestra un

ejemplo de confórmero hM para la poliproteína que contiene Q₆₂. Clasificamos la clase de confórmeros hM como un subconjunto de la clase M, de manera que el porcentaje de confórmeros hM (respecto al número total de moléculas de la muestra, n) se encuentra incluido en la clase M. En la parte derecha se muestra una correspondencia de imágenes de TEM donde se aprecian fibras amiloides formadas por los correspondientes proteínas de fusión mínima (no por toda la poliproteína), destacando la relación entre confórmeros M (y hM) con amiloidosis. De abajo a arriba, las barras de escala corresponden a 0,6, 0,3, 0,3, y 0,6 μm , respectivamente. **b)** Análisis por SMFS de pFS-2 + VAMP2. Esta IDP no amiloidogénica (Hazzard *et al.* 1999) no muestra polimorfismo conformacional. La barra de escala de la imagen de TEM corresponde a 0,6 μm . Para todas las construcciones estudiadas en la tesis, sólo los datos de la proteína huésped (NP o control), y no del portador, son representados en los histogramas presentados en las correspondientes figuras.

Hemos demostrado que el estiramiento del tracto que se encuentra por debajo del umbral de patogenicidad (Q₁₉) nunca genera picos de fuerza; **confórmeros** a los que hemos denominado "**no-mecanoestables**", NM. Es decir, al analizar la construcción pFS-2 + Q₁₉ no fueron detectadas conformaciones que ofrezcan resistencia al ser estirado (siendo el límite de detección de fuerza a una velocidad de estiramiento de 0,4 nm/ms de aproximadamente 20 pN; **Fig. 4-12a**, barras de color naranja). Un comportamiento mecánico similar se observa para IDPs no amiloidogénicas/no neurotóxicas (Li *et al.* 2001; Li *et al.* 2002), incluida la región citoplásmica de VAMP2 (Hazzard *et al.* 1999), que nosotros hemos estudiado y usado como control negativo (**Fig. 4-12b**). En concordancia con los resultados de SMFS, las construcciones portadoras de Q₁₉ o VAMP2 no mostraron capacidad de agregar o formar fibras amiloides (**Figs. 4-12 derecha, 4-6a,b y 4-9a,b**). Por el contrario, la construcción que incluye Q₃₅ mostró una amiloidogénesis moderada (**Figs. 4-12a, 4-7, 4-9a**), mientras que en SMFS no sólo exhibió numerosas conformaciones NM ($F_u \leq 20$ pN) sino también conformaciones con uno o varios picos de fuerza con valores variables de ΔL_c . Hemos denominado a éstos **confórmeros "mecanoestables"**, M ($F_u > 20$ pN; **Fig. 4-12a**, barras rojas). Los valores de ΔL_c y F_u obtenidos en las conformaciones M no se encuentran correlacionados, siendo una característica general que hemos observado en todas las NPs analizadas (**Fig. 4-13a**), y como se describió recientemente para la NP tau (Wegmann *et al.* 2011). Curiosamente, este rico polimorfismo conformacional incluía confórmeros con estabilidad mecánica muy alta. Dado que la estabilidad mecánica de las proteínas eucariotas estudiadas hasta la fecha, bajo una geometría de estiramiento N-C terminal, se encuentra por debajo de 400 pN (Oberhauser y Carrión-Vázquez 2008), definimos operativamente un subconjunto de confórmeros de la clase M, estadísticamente raros, como **confórmeros "hiper-mecanoestables"**, hM, con un valor de arbitrario $F_u \geq 400$ pN.



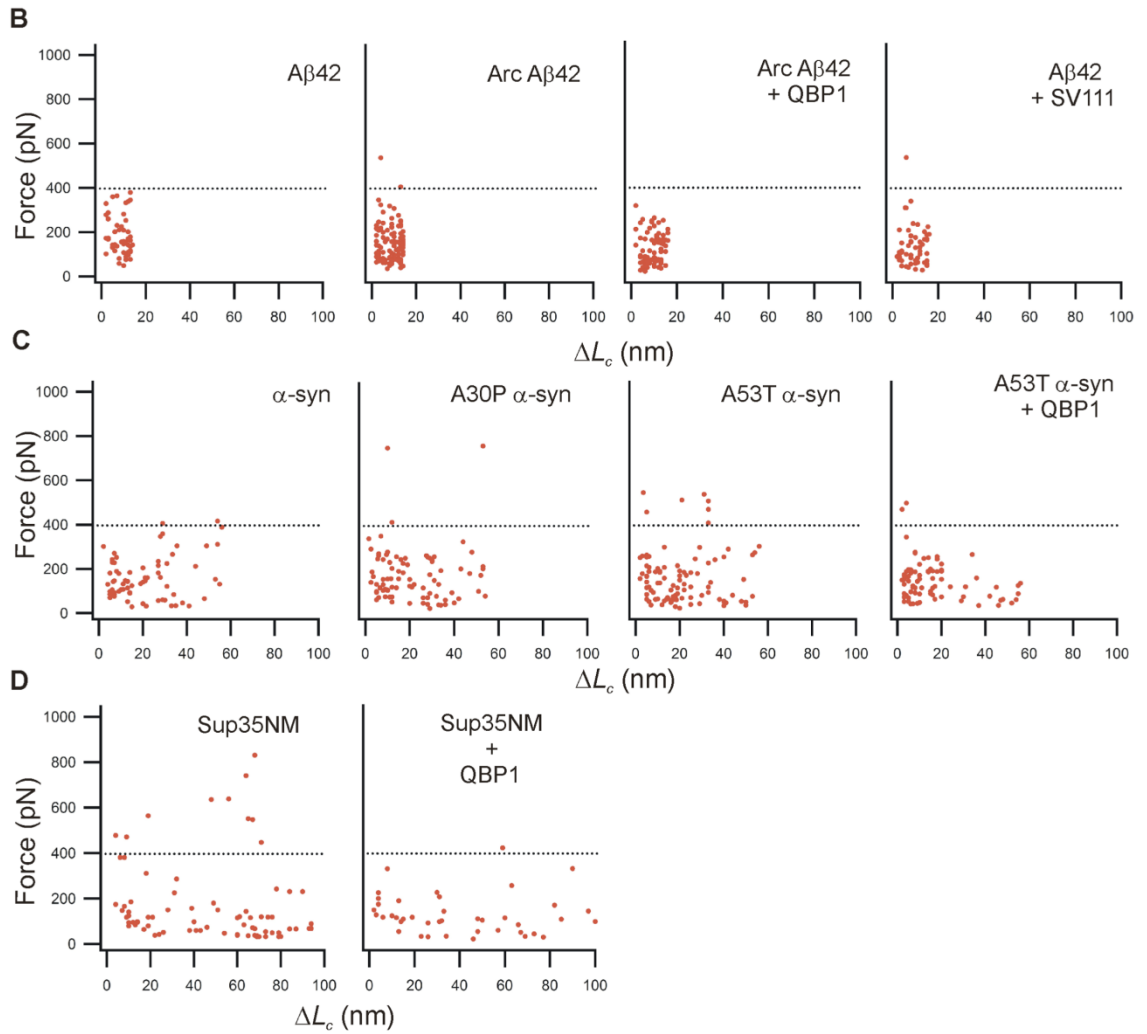


Figura 4-13. Falta de correlación entre F_u e ΔL_c . Los gráficos de dispersión muestran que no existe correlación entre los valores de F_u e ΔL_c para confórmers M de: **a)** trectos de polyQ, **b)** A β 42, **c)** α -syn, y **d)** Sup35NM. Ningún tipo de agrupamiento se observó para ninguna de las NPs estudiadas, lo que sugiere que no hay regiones específicas dentro de las NPs que medien su estabilidad mecánica. Además, el tratamiento de las muestras con los péptidos QBP1/SV111 no resultó en la pérdida de alguna población específica de datos por lo que esta observación no nos permite, en principio, extraer información estructural sobre el mecanismo de unión de ambos péptidos a las NPs sustrato.

En base a nuestro conocimiento actual sobre NPs (Chiti y Dobson 2006) y considerando los estudios recientes sobre polyQs a nivel de monómero (Nagai *et al.* 2007), es plausible asumir que los confórmers NM y M correspondan a conformaciones RC y conformaciones ricas en estructuras β , respectivamente, como se ha interpretado en trabajos anteriores (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009). En conjunto, nuestros resultados indican que la expansión Q₃₅ puede experimentar una transición estructural que permite la existencia de fluctuaciones conformacionales detectables mediante SMFS. Significativamente, Q₆₂ exhibió un polimorfismo conformacional aún mayor que a su vez incluyó un mayor número de confórmers hM (**Fig. 4-12a**). Podemos concluir por tanto, que en trectos con número de Qs cercano o superior al umbral de patogenicidad (Q₃₅ y Q₆₂) para enfermedades causadas por polyQs, aparecen conformaciones M que pueden ser detectadas por SMFS; y estas conformaciones mecánicas incluyen confórmers hM. Este polimorfismo (estimado como la frecuencia de confórmers M)

se encontró correlacionado positivamente con la longitud de polyQs, que a su vez está correlacionado con la capacidad amiloidogénica. Es interesante reseñar que recientemente se ha reportado la correlación estructural de las polyQs con el umbral patológico a nivel de monómero (Nagai *et al.* 2007).

El análisis nanomecánico de A β 42, α -syn, y Sup35NM, utilizadas como modelo de enfermedades neurodegenerativas esporádicas (Chiti y Dobson 2006), mostró que la forma wt de cada proteína exhibe un rico polimorfismo conformacional, que incluye confórmeros hM poco frecuentes, excepto para A β 42 wt (Figs. 4-14, 4-15, 4-16). La diferencia en la frecuencia de aparición de confórmeros M en NPs, en relación con IDPs no amiloidogénicas/no neurotóxicas (VAMP2, Q₁₉), son estadísticamente significativas (Tabla 4).

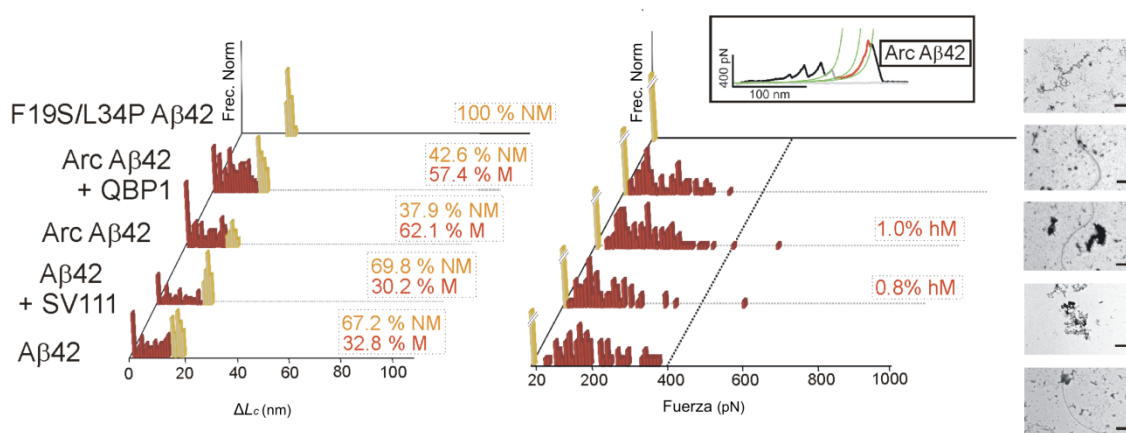


Figura 4-14. Análisis nanomecánico de A β 42. Histogramas de ΔL_c (izquierda) y F_u (derecha) para poliproteínas pFS-2 + A β 42 wt y variantes. La proteína A β 42 wt (primera fila) mostró un amplio polimorfismo conformacional, pero no se detectaron confórmeros hM. La incubación de A β 42 con SV111 dio resultados estadísticamente similares a A β 42 wt, lo que sugiere que los datos de SMFS reflejan eventos de ruptura de interacciones intramoleculares, en oposición a interacciones intermoleculares, inhibidas por el péptido SV111 (Arslan *et al.* 2010). En la forma familiar de la enfermedad de Alzheimer analizada, Arc (E22G) A β 42, se produjo un aumento en el número de confórmeros M y hM en comparación con A β 42 wt. La incubación con péptido QBP1 no alteró la frecuencia de formación de confórmeros M en Arc A β 42. Para el doble mutante F19S/L34P A β 42 sólo se observaron conformaciones NM, a pesar del mayor tamaño muestral (Tabla 4). En la parte de la derecha se muestran imágenes obtenidas por TEM de fibras amiloides formadas por las proteínas de fusión mínima correspondientes. De abajo a arriba, las barras de escala corresponden a 0,6, 0,6, 0,45, 0,35, y 0,9 μ m, respectivamente. Un ejemplo de confórmero hM de Arc A β 42 es mostrado en el recuadro.

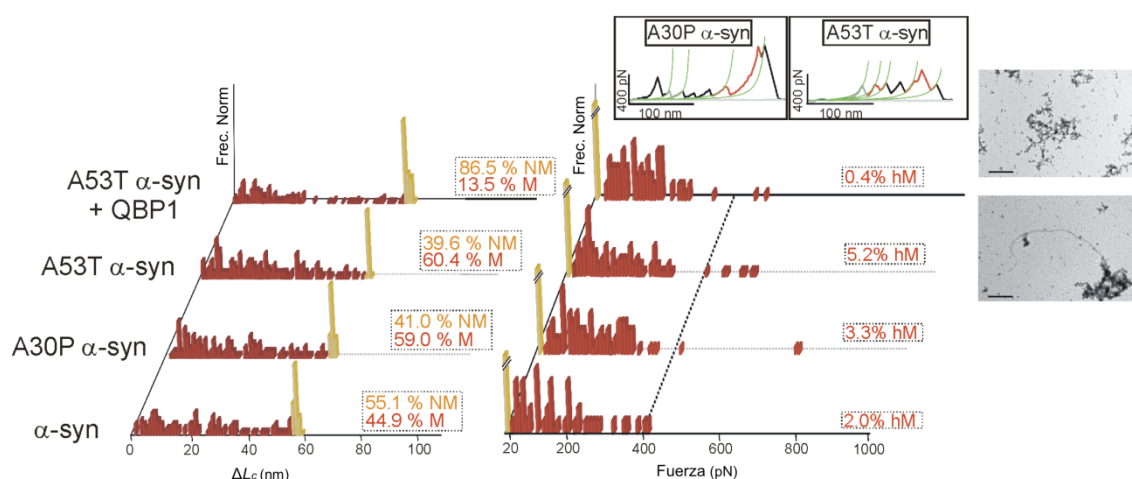


Figura 4-15. Análisis nanomecánico de α -syn. Histogramas de ΔL_c (izquierda) y F_u (derecha) para poliproteínas pFS-2 + α -syn (wt y mutantes). La proteína α -syn wt (primera fila) exhibió un rango amplio de polimorfismo que iba desde confórmeros NM (barras naranjas) hasta confórmeros M (barras rojas), que incluían confórmeros hM. En las formas familiares de enfermedad de Parkinson analizadas, A30P y A53T, la frecuencia de eventos M y hM se ve aumentado en relación a α -syn wt. El tratamiento con péptido QBP1 redujo la formación de confórmeros M y hM en A53T α -syn. En la parte de la derecha se muestran imágenes de TEM de fibras amiloides formadas por ubi + A53T α -syn. En presencia de QBP1 (imagen superior) no hubo evidencias de formación de fibras amiloides. De abajo a arriba, las barras de escala corresponden a 0,45 y 0,6 μ m, respectivamente. Ejemplos de confórmeros hM de A30P y A53T α -syn son mostrados en el recuadro.

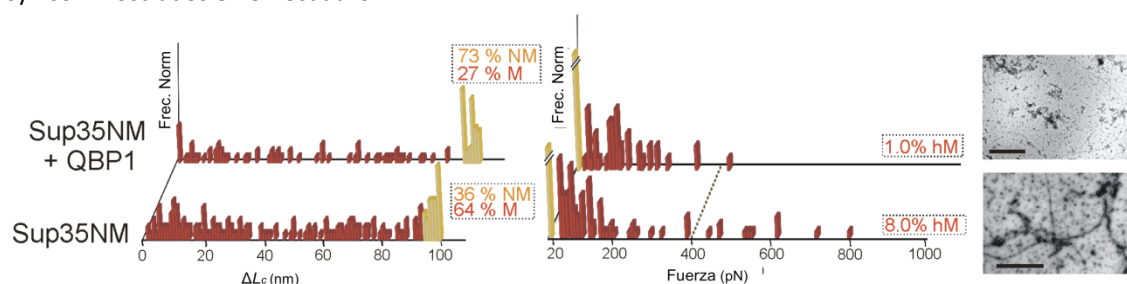


Figura 4-16. Análisis nanomecánico de Sup35NM. Histogramas de ΔL_c (izquierda) y F_u (derecha) para la poliproteína pFS-2 + Sup35NM. Al igual que las proteínas wt en las Figuras 4-14 y 4-15, Sup35NM (primera fila) mostró un rico polimorfismo conformacional, que incluía confórmeros hM poco frecuentes. El tratamiento con el péptido QBP1 (última fila), disminuyó la formación de confórmeros M y hM, como se observó para Q₆₂ y α -syn A53T (Figs. 4-12 y 4-15). A la derecha se muestran imágenes de fibras amiloides y oligómeros de I27 + Sup35NM tomadas por TEM. QBP1 redujo claramente la formación de fibras amiloides y oligómeros (imagen superior). Las barras de escala corresponden a 0,6 (parte superior) y 0,4 μ m (parte inferior).

En la siguiente tabla se recogen todos los datos de SMFS obtenidos en este estudio:

| Proteína | | | n | NM (%) | M (%) | hM (%) |
|----------|-----------------|--------|-----|--------|-----------|--------|
| PolyQ | Q ₁₉ | | 111 | 100 | 0 | 0 |
| | Q ₃₅ | | 100 | 95.0 | 5.0 (4) | 1 |
| | Q ₆₂ | -QBP1 | 107 | 92.5 | 7.5 (5) | 2.8 |
| | | +QBP1 | 124 | 96.7 | 3.3 (3) | 0 |
| VAMP2 | I27-VAMP2 | | 188 | 100 | 0 | 0 |
| | Ubi-VAMP2 | | 234 | 100 | 0 | 0 |
| Aβ | Aβ42 | -SV111 | 116 | 67.2 | 32.8 (9) | 0 |
| | | +SV111 | 128 | 69.8 | 30.2 (8) | 0.8 |
| | Arc Aβ42 | -QBP1 | 102 | 37.9 | 62.1 (10) | 1 |
| | | +QBP1 | 108 | 42.6 | 57.4 (9) | 0 |
| | F19S/L34P Aβ42 | | 396 | 100 | 0 | 0 |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|--------------|-----|------|-----------|---------------|
| α-syn | wt | | 98 | 55.1 | 44.9 (10) | 2 ± 1 |
| | A30P | | 92 | 41.0 | 59.0 (10) | 3.3 |
| | A53T | -QBP1 | 96 | 39.6 | 60.4 (10) | 5.2 ± 1.0 |
| | | +QBP1 | 259 | 86.5 | 13.5 (4) | 0.4 |
| Sup35NM | -QBP1 | | 100 | 36.0 | 64.0 (10) | 8 |
| | +QBP1 | | 100 | 73.0 | 27.0 (9) | 1 |

Tabla 4. Resumen del análisis nanomecánico de NPs. Los experimentos de SMFS fueron realizados en construcciones de poliproteína basadas en el vector pFS-2, aunque los datos presentados se refieren únicamente a las NPs huéspedes. n: tamaño muestral. NM: confórmero no mecanoestable (sin picos de fuerza detectada: $F_u \leq 20$ pN). M: confórmero mecanoestable (por lo menos un pico de fuerza: $F_u > 20$ pN). hM: confórmero hiper-mecanoestable (subconjunto de confórmeros M con al menos un pico de fuerza con $F_u \geq 400$ pN). El error asociado con la frecuencia de aparición de eventos hM se obtuvo suponiendo un error de 10 pN, aproximadamente la mitad del límite de detección de nuestro set-up experimental, en la medida de SMFS, y restando o añadiendo los eventos que se vieron afectados por la aplicación de este rango en los cálculos. Debido al pequeño número de eventos, la frecuencia de confórmeros hM en las NPs no es estadísticamente significativa. Sin embargo, correlaciona muy bien con el % de M. El análisis estadístico mostró que, con excepción de los tractos de polyQ (para el que el número de eventos M es demasiado bajo), las diferencias en los eventos M fueron estadísticamente significativas para los siguientes pares: NP y no-NP, NP y NP familiar, NP (a excepción de Arc A β 42) y NP + QBP1. Las diferencias no resultaron estadísticamente significativas para los siguientes pares: A β 42 y A β 42 + SV111, Arc A β 42 y Arc A β 42 + QBP1 y para proteínas que no causan neurodegeneración. El número entre paréntesis corresponde con la mitad del intervalo de confianza del 95% para %M (o NM, modelado como una distribución de Bernoulli), mientras que los números después del \pm son los errores experimentales de SMFS.

En la forma wt de las cuatro NPs analizadas, la frecuencia de confórmeros M varió desde el 0% en Q₁₉, siendo Q₂₁ es el umbral patológico mínimo detectado en enfermedades causadas por polyQs, específicamente en SCA6 (Uversky 2009), hasta el 64% en Sup35NM. Estos valores correlacionan positivamente con la densidad de fibras amiloides formadas por cada NP específica (Figs. 4-9, 4-12, 4-14, 4-15, 4-16 y Tablas 3 y 4). La frecuencia de confórmeros hM para las formas wt varió de 0 a 8% (Figs. 4-12, 4-14, 4-15, 4-16 y Tabla 4). Estos eventos poco frecuentes presentaron fuerzas de desplegamiento extremadamente altas, de hasta ~800 pN, mayores que las fuerzas reportadas para las proteínas mecánicamente más estables descritas hasta la fecha; módulos de cohesina de la escafoldingina, una proteína bacteriana (Valbuena *et al.* 2009), y justo por debajo del rango de fuerza requerido para romper un enlace covalente (Grandbois *et al.* 1999). El número de moléculas (o confórmeros) de cada grupo (NM, M y hM) se muestra en la **Tabla 4** y es independiente del número de picos de fuerza detectados por cada molécula. Para que una molécula sea como M, debe exhibir al menos un pico de fuerza. Sin embargo, frecuentemente, más de un pico de fuerza fue observado por cada molécula de NP, lo que sugiere la presencia de más de una región estructurada por molécula en los confórmeros M (Fig. 4-17 y Tabla 5).

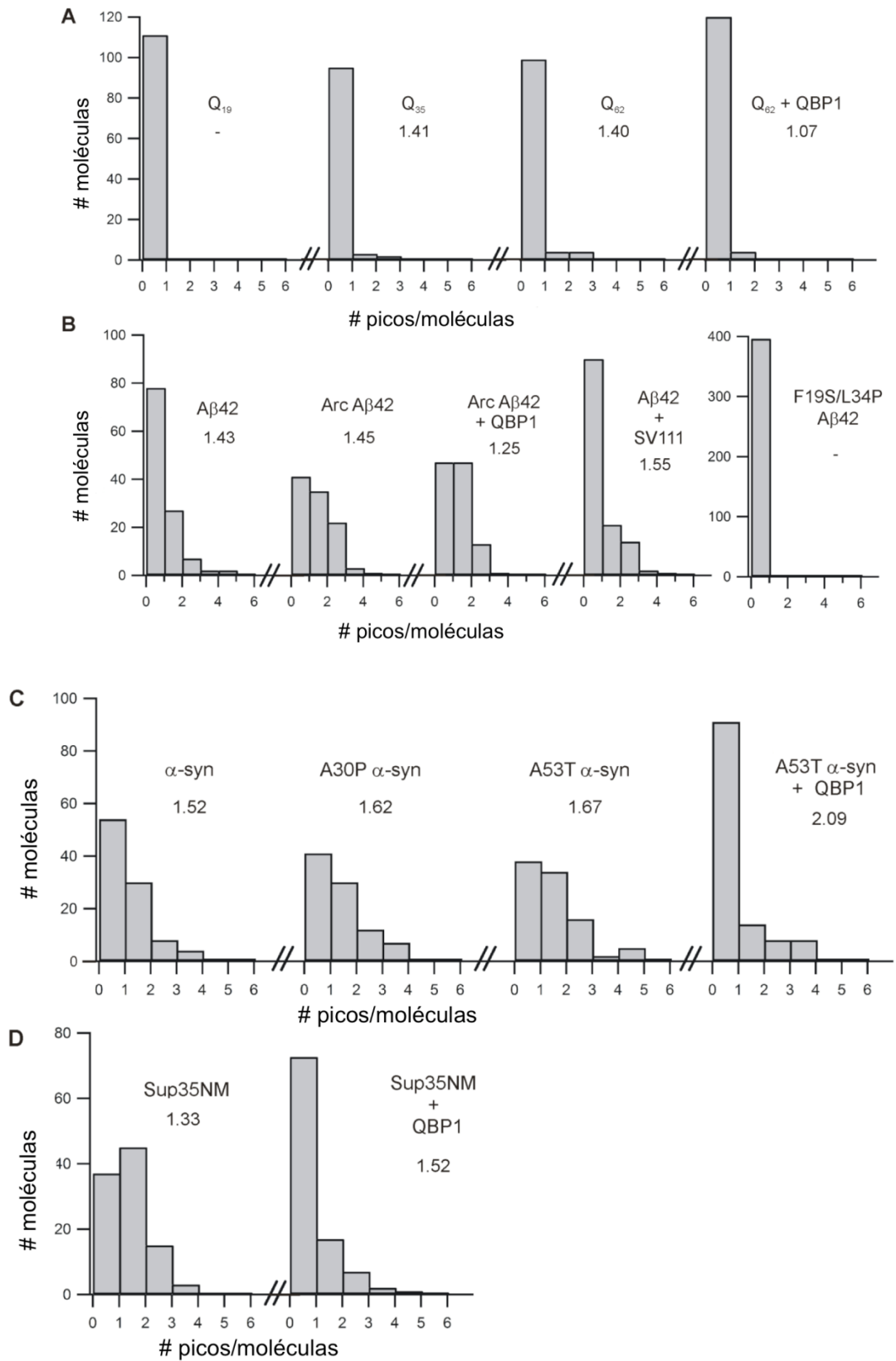


Figura 4-17. Efecto de formas familiares de enfermedades y QBP1 sobre el número de regiones estructuradas por molécula. El número promedio de picos de fuerza por molécula es mostrado para: **a)** trectos de polyQ, **b)** Aβ42, **c)** α-syn, y **d)** Sup35NM. Las conformaciones NM corresponden con 0 picos de fuerza y se excluyen de los cálculos de la media mostrada en la figura. Las formas familiares de enfermedades aumentaron el número de picos de fuerza por molécula, lo que sugiere que aumentan la propensión a adquirir estructuras que ofrecen resistencia al estiramiento. Mientras que QBP1 redujo el

número de picos/molécula en Q₆₂ y Arc A β 42, pero no en A53T α -syn o Sup35NM. El péptido SV111 no alteró dicho número para A β 42.

Cabe señalar que el número, y por tanto la frecuencia, de confórmeros M puede ser en realidad mayor que la estimada debido a la existencia de registros adicionales que podrían corresponder a **espectros fuerza-extensión incompletos**. Éstos corresponden a registros compatibles con el desplegamiento de un módulo portador que alberga un elemento mecanoestable, pero que no es observado debido al **desanclaje prematuro de la molécula** bien de la punta o del sustrato, terminándose el experimento sin llegar a estirar toda la molécula completa. Aunque la mecanoestabilidad es una propiedad estocástica, la fuerza de estos **eventos de desanclaje prematuro** debería ser generalmente menor que la fuerza necesaria para desplegar la hipotética estructura formada por la NP, que por tanto no se registra porque el experimento termina con el pico del desanclaje. Este tipo de confórmeros han sido llamados **confórmeros M “putativos”** y un subconjunto de ellos correspondería a eventos **hM putativos** (Fig. 4-18 y Tabla 5). Aunque estos hipotéticos eventos no fueron incluidos en el tamaño muestral n, es interesante observar que existe una **buena correlación entre los eventos hM putativos y reales** en las diferentes NPs y condiciones testadas (Tabla 5).

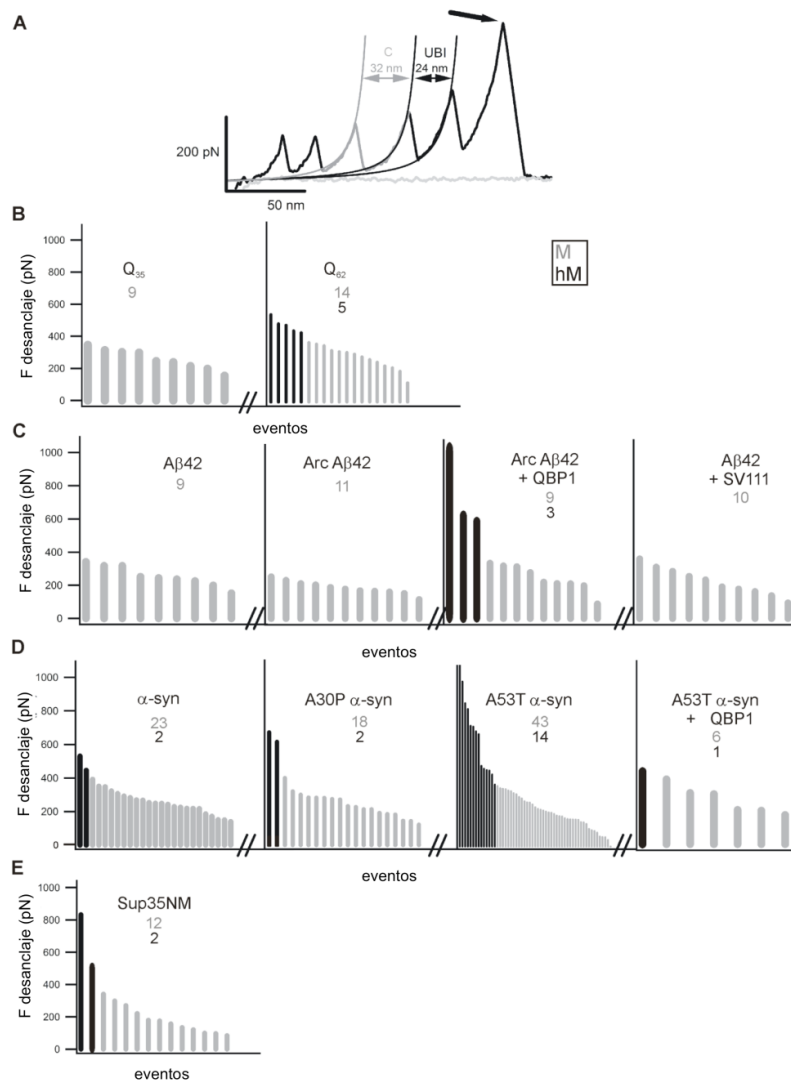


Figura 4-18. Eventos putativos adicionales. a) Ejemplo de un evento considerado como hM putativo. En gris se muestra el pico de la fuerza debido al desplegamiento del portador (C) y una región de la NP más corta que la longitud teórica máxima. El valor ΔL_c asociado con este pico de fuerza es mayor que el de una repetición de ubi normal, pero no tan grande como el esperado si se estirase la NP completa. Para explicar estos eventos frecuentes, suponemos que los anclajes de la poliproteína (a la punta o al sustrato) no se mantuvieron hasta el final del experimento, es decir, la molécula de poliproteína pudo haberse desprendido antes de que se desplegara completamente la región atrapada, como podría ocurrir en Dougan *et al.* 2009. Por tanto, es razonable suponer que su estabilidad mecánica sería superior a la fuerza de desanclaje (último pico en el espectro, indicado por la flecha). **b-e)** Valores de fuerza de desanclaje frente a número de registros considerados como eventos putativos para tractos de polyQ, A β 42, α -syn, y Sup35NM, respectivamente. Los eventos hM putativos (con fuerzas de desanclaje ≥ 400 pN) son mostrados en negro. Este análisis sugiere que la población de confórmeros hM observada directamente en nuestro estudio representa una infra-estimación de la tendencia real de las NPs para formar este tipo de confórmeros. En b-e) cada barra vertical representa un evento único (una molécula). Nótese que tanto Q₆₂ + QBP1 como Sup35NM + QBP1 no se encuentran representados debido a que en estas condiciones no se produjeron eventos putativos hM.

| Proteína | | | M (%) | Putativo M | hM (%) | Putativo hM | # Picos / molécula |
|---------------|------------------------|--------|-----------|------------|---------------|-------------|--------------------|
| PolyQ | Q ₁₉ | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Q ₃₅ | | 5.0 (4) | 9 | 1 | 0 | 1.41 |
| | Q ₆₂ | -QBP1 | 7.5 (5) | 19 | 2.8 | 5 | 1.4 |
| | | +QBP1 | 3.3 (3) | 0 | 0 | 0 | 1.07 |
| A β | A β 42 | -SV111 | 32.8 (9) | 9 | 0 | 0 | 1.43 |
| | | +SV111 | 30.2 (8) | 10 | 0.8 | 0 | 1.55 |
| | Arc A β 42 | -QBP1 | 62.1 (10) | 11 | 1 | 0 | 1.45 |
| | | +QBP1 | 57.4 (9) | 12 | 0 | 3 | 1.25 |
| | F19S/L34P A β 42 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| α -syn | wt | | 44.9 (10) | 25 | 2 \pm 1 | 2 | 1.52 |
| | A30P | | 59.0 (10) | 20 | 3.3 | 2 | 1.62 |
| | A53T | -QBP1 | 60.4 (10) | 57 | 5.2 \pm 1.0 | 14 | 1.67 |
| | | +QBP1 | 13.5 (4) | 7 | 0.4 | 1 | 2.09 |
| Sup35NM | -QBP1 | | 64.0 (10) | 14 | 8 | 2 | 1.33 |
| | +QBP1 | | 27.0 (9) | 0 | 1 | 0 | 1.52 |

Tabla 5. Eventos putativos y número de regiones estructuradas por molécula. # picos/molécula: Número promedio de regiones mecanoestables (picos de fuerza) por molécula. Los valores reportados fueron calculados considerando sólo confórmeros M, excluyendo los monómeros que presentan una conformación NM (que resultan en 0 picos de fuerza, ver **Figura 4-17**).

Tomados todos los datos en su conjunto, el análisis de SMFS reveló que mientras que VAMP2, una IDP no neurotóxica/no amiloidogénica, muestra una resistencia mecánica al desplegamiento sin picos de fuerza detectables, todas las NPs estudiadas presentan un comportamiento similar, mostrando un alto grado de polimorfismo conformacional mecánico que incluye confórmeros hM poco frecuentes. Este comportamiento correlaciona con amiloidogénesis y, de acuerdo con resultados anteriores, uno (o varios) cambios conformacionales críticos en el monómero conduciría a la generación de especies primarias tóxicas (Nagai *et al.* 2007). Hemos testado esta **hipótesis de trabajo** mediante el análisis de condiciones en las que la enfermedad y/o amiloidogénesis resultan afectadas de dos formas distintas: a) siendo mitigadas mediante un **péptido que inhibe el proceso de oligomerización** (péptido SV111), una **mutación defectiva para agregación**, o un **péptido que inhibe el cambio conformacional a monómero β** (péptido QBP1), y b) siendo intensificadas por **formas familiares de la enfermedad**. De acuerdo con la hipótesis postulada, el polimorfismo

conformacional (y frecuencia de M/hM) en estas cuatro condiciones (que iremos detallando a continuación) debería encontrarse inalterado, abolido, disminuido o aumentado, respectivamente.

La inhibición de la oligomerización no altera el polimorfismo conformacional

Si bien el pFS-2 es una estrategia ideal para evitar contaminación de datos por interacciones inespecíficas en la región proximal de los registros, para que los eventos de fuerza puedan ser atribuidos inequívocamente al desplegamiento intramolecular de monómeros de una NP debemos ser capaces de descartar otras posibles interacciones. Una posible fuente de contaminación a tener en cuenta son posibles interacciones intermoleculares de la molécula de NP con otras moléculas de NP circundantes. Es un hecho que las NPs presentan una propensión intrínseca a oligomerizar (Chiti y Dobson 2006), proceso en el que se establecen interacciones intermoleculares entre monómeros. Por tanto, descartar interacciones intermoleculares es crítico en la caracterización del monómero en este tipo de proteínas. La agregación amiloide es un proceso autocatalítico que, al igual que ocurre en reacciones de condensación, sólo se produce por encima de una concentración crítica, y es extremadamente lento en la etapa de oligomerización inicial. Las concentraciones críticas que se citan en la bibliografía, aunque varían considerablemente entre las distintas NPs, y para la misma NP en diferentes condiciones, tienden a estar en el rango micromolar alto (Frieden 2007). En nuestros experimentos de SMFS, con el fin de intentar minimizar interacciones entre monómeros, se usó una concentración de trabajo muy baja de la NP, en el intervalo micromolar bajo, que en gran medida debería ralentizar el proceso de oligomerización (Frieden 2007). En concreto, las poliproteínas de fusión pFS-2 se han utilizado en el rango de 2-3 μM , donde la fracción amiloidogénica representa aproximadamente el 5-25% de la longitud total de la poliproteína. Además, hay que señalar que el hecho de situar la NP en el interior de la poliproteína pFS-2 reduce drásticamente la cinética de formación de fibras amiloides: utilizando una concentración de pFS-2 + Sup35NM por encima de la concentración crítica amiloidogénica (10-20 μM , 7-10 veces mayor a la concentración usada en los experimentos de SMFS), la densidad de la fibras después de un mes de incubación a 4°C fue de más de un orden de magnitud inferior a la observada en las mismas condiciones para Sup35NM o I27 + Sup35 (**Fig. 4-9e**, paneles 6-8). En consecuencia, bajo nuestras condiciones experimentales no esperamos una oligomerización muy significativa.

El péptido SV111, que inhibe la oligomerización y fibrillogénesis de A β 42 tras unirse de manera específica a la horquilla β formada por el monómero de A β 42 (Arslan *et al.* 2010), se ha utilizado para estudiar el efecto del bloqueo de oligomerización sobre el polimorfismo conformacional de A β 42. Asumiendo que no debe afectar a las fluctuaciones conformacionales del monómero libre de A β 42, la incubación de A β 42 con SV111 mostró resultados similares al control sin tratar, de forma que el polimorfismo conformacional se mantuvo inalterado (**Figs. 4-14 y Tabla 4**), mientras que la agregación / fibrillogénesis de nuestra proteína de fusión mínima específica resultó inhibida (**Figs. 4-14, 4-9c y Tabla 3**). Dado que este péptido inhibe selectivamente el proceso de oligomerización, este experimento fue utilizado como control para descartar una contribución significativa de interacciones intermoleculares en nuestros datos de

SMFS, lo que sugiere que el comportamiento observado proviene del desplegamiento de estructuras formadas en el monómero de NPs, mantenidas fundamentalmente por interacciones intramoleculares.

Un mutante anti-amiloidogénico suprime el polimorfismo conformacional

También hemos considerado la posibilidad de que el polimorfismo conformacional mecánico observado fuese atribuido erróneamente a interacciones intramoleculares en monómeros de NP, siendo en realidad un artefacto inducido por la ruptura de interacciones indeseadas de la poliproteína al sustrato o a la punta, o bien por interacciones no nativas entre portador-huésped inducidas tras la inserción. Para descartar estas dos posibilidades, se realizaron dos tipos diferentes de experimentos control. En primer lugar, para descartar la posibilidad de que la poliproteína de fusión pudiese haber inducido la formación de estructuras mecanoestables en la NP huésped, examinamos una IDP no fibrillogénica/no neurotóxica (Hazzard *et al.* 1999): la región citoplásmica de VAMP2, fusionada a los dos portadores usados en el estudio; ubi e I27. En ninguno de los dos casos se detectó polimorfismo conformacional, ni agregación/fibrillogénesis (**Figs. 4-12b, 4-6b, 4-9b y Tablas 3 y 4**), indicando que el polimorfismo conformacional es intrínseco a la NP huésped y está asociado al comportamiento fibrillogénico, es decir, no está inducido por la poliproteína de fusión. En segundo lugar, con el fin de descartar la posibilidad de que los hipotéticos desanclajes de los elementos del AFM pudiesen ser la fuente de los picos de fuerza observados en los registros, analizamos el doble mutante F19S/L34P A β 42, incapaz para oligomerizar/fibrilar (Wurth *et al.* 2002). Para este mutante obtuvimos resultados similares a los mostrados para VAMP2 (**Figs. 4-14, 4-6c, 4-9c y Tablas 3 y 4**). Parece razonable suponer que el mutante F19S/L34P A β 42 (con una secuencia casi idéntica al péptido wt, excepto el cambio de dos posiciones) debería tener una propensión química similar a A β 42 wt para unirse a los elementos del AFM (punta/sustrato) y por tanto, debería mostrar una fuente de ruido similar si este hipotético artefacto estuviese presente. Estos resultados excluyen la posibilidad de que el desanclaje de A β 42 a los elementos del AFM pudiesen estar contaminando los datos seleccionados e incluidos en el análisis. También, la ausencia de picos de fuerza en el análisis de F19S/L34P A β 42 es una prueba adicional de que los picos de fuerza no tienen su origen en interacciones no nativas entre NP y portador.

De manera análoga, la ausencia total de picos de fuerza en Q₁₉ sugiere que los eventos observados para Q₃₅ y Q₆₂ no se originaron a partir de interacciones no nativas entre el portador y la NP o por interacciones con los elementos del AFM ya que la propensión química a interactuar entre estas construcciones debería ser muy similar, dado que la única diferencia es el número de residuos de Qs.

De esta forma, podemos concluir que, en las condiciones experimentales empleadas y utilizando criterios muy estrictos para la identificación de moléculas individuales libres de artefactos, se han seleccionado eventos de fuerza que provienen *bona fide* de la ruptura de interacciones intramoleculares, que mantienen conformaciones estructuradas del monómero de la NP. Durante el proceso de selección se desecharon muchos registros que no cumplían los criterios de selección, algunos de los cuales podrían perfectamente corresponder a interacciones adicionales que no son de interés en este estudio.

Formas familiares de enfermedades neurodegenerativas incrementan el polimorfismo conformacional

A continuación se estudió el efecto de formas familiares de enfermedades neurodegenerativas representativas sobre el polimorfismo conformacional, utilizando formas dominantes responsables tanto de la aparición temprana de la enfermedad, como de la aceleración de la cinética de oligomerización (Chiti y Dobson 2006; Uversky 2009). Además de **Q₃₅** y **Q₆₂**, también se estudió la mutación **arctic** (Arc: E22G) en A β 42, implicada en una forma familiar de la enfermedad de Alzheimer, así como las mutaciones **A30P** y **A53T** en α -syn, involucradas en Parkinsonismo familiar (Chiti y Dobson 2006; Uversky 2009). Al igual que ocurría con **Q₃₅** y **Q₆₂**, para todos los mutantes analizados se observó un aumento en la frecuencia de confórmeros M, incluyendo hM (**Figs. 4-14, 4-15 y Tabla 4**). De manera similar, el número de regiones mecanoestables por molécula se vio incrementada para cada mutante analizado (**Fig. 4-17 y Tabla 5**). Por último, dos de las formas familiares de estas enfermedades aumentaron el número de eventos hM putativos (**Q₆₂** y **A53T** α -syn, **Fig. 4-18 y Tabla 5**). En conjunto, nuestros resultados indican que las formas familiares de estas enfermedades aumentan la propensión a formar confórmeros M respecto a las formas wt, efecto que se correlaciona con la capacidad de agregar / fibrilar, al menos de forma clara para el caso de las polyQs. Por otra parte, el incremento de polimorfismo conformacional también podría explicar el carácter dominante de estas mutaciones.

Un inhibidor promiscuo de la transición estructural disminuye el polimorfismo conformacional

Finalmente se analizó si el polimorfismo conformacional de las NPs se encontraba afectado por el **péptido QBP1**. Este inhibidor de amiloidosis bloquea, tras su unión a conformaciones RC (Armen *et al.* 2005; Nagai *et al.* 2007), el cambio conformacional crítico hacia monómero rico en estructura β de polyQs expandidas patogénicas (ver **Sección 1.2.4**), suprimiendo oligomerización, amiloidogénesis, citotoxicidad (Nagai *et al.* 2007) y neurodegeneración (Popiel *et al.* 2007). Concretamente, en nuestros estudios hemos utilizado el **núcleo mínimo activo** de este péptido, **QBP1-M8** (Tomita *et al.* 2009). La incubación de QBP1 con la proteína de fusión mínima portadora de **Q₆₂** abolió completamente la formación de fibras amioideas (**Figs. 4-9a y Tabla 3**), mientras que en SMFS, su incubación con la poliproteína portadora de **Q₆₂** redujo la frecuencia de conformaciones M, incluidas las formas hM, detectadas como putativas se vieron reducidas (**Figs. 4-12a, 4-18b y Tablas 4 y 5**), al igual que el número de eventos mecanoestables por molécula (**Fig. 4-17a**).

En lo que se había diseñado como un experimento de control negativo, testamos el efecto de este péptido en las otras tres NPs analizadas, concretamente en Arc A β 42 (**Fig. 4-14**), **A53T** α -syn (**Fig. 4-15**) y el prión de levadura Sup35NM (**Fig. 4-16**). Sorprendentemente, QBP1 disminuyó fuertemente la formación de confórmeros M (detectados y putativos) en los casos de **A53T** α -syn y Sup35NM (**Figs. 4-15, 4-16, 4-18d,e y Tablas 4 y 5**). La agregación y fibrilación también se vio reducida o suprimida por QBP1 en estas dos NPs (**Fig. 9e,d y Tabla 3**). En el caso

de Sup35NM, el efecto del péptido QBP1 sobre su capacidad de fibrilar resultó incompleto, como muestra la formación de algunos oligómeros y fibras amiloides en las imágenes de TEM (**Figs. 4-9e**), mientras que el efecto sobre A53T α -syn no fue conclusivo, dado el bajo número de fibras formado por este mutante en ausencia del inhibidor (**Figs. 4-9d**). Curiosamente, en las condiciones específicas utilizadas en los experimentos mostrados, QBP1 no muestra ningún efecto significativo sobre Arc A β 42, ya sea en el polimorfismo conformacional (**Fig. 4-14 y Tabla 4**) o en su capacidad de fibrilación (**Fig. 4-9c y Tabla 3**). Por otra parte, la frecuencia de aparición de eventos hM en Arc A β 42 sin tratar era tan bajo, el más bajo de las 4 NPs, que cualquier efecto aparente no puede considerarse significativo. Para confirmar la ausencia de efecto inhibitor del QBP1 sobre A β 42, se probaron concentraciones crecientes (desde 100 μ M a 1 mM) de QBP1 en A β 42 aislado (generado por síntesis química, ver sección de **Materiales y Métodos**), no observándose efecto alguno en la capacidad de formación de fibras amiloides (**Fig. 4-9c**).

Aparte del polimorfismo conformacional encontrado para todas las NPs estudiadas, estos resultados apuntan a la existencia de características moleculares comunes a nivel de monómero en al menos tres de las cuatro NPs estudiadas (polyQs expandidas, α -syn y Sup35NM) ya que todas ellas son reconocidas e inhibidas, en mayor o menor medida, por QBP1. A pesar de las similitudes encontradas, la incapacidad de QBP1 por reconocer A β 42 indica que puede haber alguna variación estructural en el comienzo de la amiloidogénesis asociada a la neurodegeneración. En relación a esto, hay que señalar que los experimentos de agregación y fibrillogénesis (**Figs. 4-6 a 4-9 y Tabla 3**) sugieren que el efecto inhibitor de QBP1 es más fuerte en polyQs expandidas que en A53T α -syn o Sup35NM, mientras que no afecta a Arc A β 42 (**Figs. 4-6c, 4-9c y Tabla 3**). Este hecho se encuentra claramente correlacionado con los experimentos de SMFS, donde no se observa efecto significativo sobre el polimorfismo conformacional de Arc A β 42 (**Fig. 4-14**).

5. Discusión

5. Discusión

Las **enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas** están gobernadas por un mecanismo molecular aparentemente común, al menos en sus etapas finales: ciertas proteínas (denominadas colectivamente neurotóxicas) y generalmente sin estructura definida adquieren conformaciones parcialmente estructuradas en determinadas circunstancias. Estas nuevas estructuras promueven los procesos de oligomerización y posterior fibrillogénesis, provocando la consiguiente desregulación de múltiples mecanismos celulares que desemboca en la muerte celular (ver **Sección 1.2.3**). Todavía no se conocen los factores que activan estos mecanismos moleculares fatales, ni las causas por las que afectan a determinados tipos celulares y no a otros, o de por qué afectan con mayor prevalencia a ciertos sectores de la población. Sin embargo, ha habido un gran avance en la comprensión genética y estructural de los mecanismos subyacentes de estas patologías, lo que nos permite construir modelos de causalidad que podrían ayudarnos a establecer las bases moleculares de estas enfermedades.

Las **técnicas MMI** son ideales para analizar el polimorfismo conformacional de las NPs. En concreto, el uso de SMFS es realmente prometedor, y recientemente se ha utilizado para tratar de estudiar el comportamiento del estado monomérico de estas proteínas (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009; Dougan *et al.* 2009; Wegmann *et al.* 2011). Sin embargo, dada la **naturaleza heterogénea y desordenada de las IDPs**, junto con su **tendencia a oligomerizar y agregar**, hace que su análisis sea muy complejo. Durante el desarrollo de esta tesis, hemos realizado un análisis exhaustivo usando el modo *length-clamp* de SMFS (ver **Sección 1.3.2.1.2**) de cuatro NPs; el péptido A β 42, α -syn, polyQs y Sup35NM (como modelo de prión humano), directamente relacionadas con el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas más representativas; enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades causadas por expansión del triplete CAG y enfermedades priónicas, respectivamente. Desde el nacimiento de **SMFS**, se han establecido una serie de **criterios mínimos** para únicamente incluir en el análisis datos generados a partir de moléculas individuales. Uno de los avances más significativos fue el uso de **poliproteínas** (ver **Sección 1.3.2.2**), usadas como un **marcador de monomolecularidad** debido al patrón periódico que generan tras su desplegamiento (Carrión-Vázquez *et al.* 1999; Steward *et al.* 2002). Sin embargo, aunque son muy útiles y fiables en gran parte de las ocasiones, pueden resultar insuficientes para algunos casos, como ocurre con las **IDPs**, y en concreto con las **NPs amiloidogénicas**.

Por ello, para realizar un análisis determinante mediante SMFS, en esta tesis hemos desarrollado satisfactoriamente el vector de expresión **pFS-2**, basado en la familia de vectores pFS (Oroz *et al.* 2012). Esta familia a su vez está basada en la estrategia de *cassette* expuesta en Steward *et al.* 2002, con la diferencia del uso de ubi como marcador de monomolecularidad en lugar de módulos de I27. Las propiedades nanomecánicas de ubi se encuentran ampliamente descritas en la bibliografía (Carrión-Vázquez *et al.* 2003), contando con la ventaja añadida de poseer actividad chaperona que pudiera asistir al plegamiento de la proteína bajo estudio cuando se encuentra en el extremo N-terminal de ésta (Finley *et al.* 1989). La variante pFS-2 de esta familia de vectores, basada en una estrategia de protección mecánica de la proteína de interés, presenta una ventaja adicional que lo hace un sistema idóneo para el estudio y análisis inequívoco de proteínas que presentan estabilidad mecánica baja, proteínas que no muestran

estabilidad mecánica detectable por SMFS (como las IDPs) y aquellas que no presentan un plegamiento definido, sino que se encuentran fluctuando entre diferentes conformaciones, como es el caso de las IDPs implicadas en enfermedades neurodegenerativas con componente amiloide (Hervás *et al.* 2012).

De manera general, el vector pFS contiene varios elementos listados a continuación que lo hacen robusto, potente, y el sistema de elección para las aplicaciones típicas de esta técnica (Oroz *et al.* 2012):

1. Contiene etiquetas de purificación por afinidad en cada extremo (His-tag y Strp-tag), que favorecen la obtención de **preparaciones enriquecidas en especies full-length** de la proteína en la muestra, frente a especies degradadas o truncadas.
2. Contiene elementos en cada extremo para el **anclaje covalente y selectivo** a superficies de AFM tratadas mediante métodos establecidos (Histag-NTA-Ni²⁺; cisteínas-oro). En el extremo N-terminal contiene un **His-tag**, que puede emplearse como una etiqueta de inmovilización en el sustrato del AFM siguiendo el protocolo de Hossain *et al.* 2006, mientras que en el extremo C-terminal contiene **dos de residuos cisteína** que pueden emplearse para su anclaje covalente a sustratos recubiertos de oro (Rief *et al.* 1997).
3. Es un **sistema de clonaje muy versátil**, con numerosas dianas de enzimas de restricción que permiten un proceso de clonaje simple y direccional de cualquier proteína.
4. Incorpora un fragmento de una IDP no amiloidogénica, el **polipéptido N2B** de titina cardíaca humana, que no ofrece resistencia al estiramiento (Li *et al.* 2002) y que actúa como un puente espaciador de la región proximal de los espectros, zona generalmente contaminada por interacciones inespecíficas, evitando así la posible contaminación de los datos (ver **Sección 1.3.2.1.2**).
(Hasta aquí las características son comunes a toda la familia de vectores pFS).
5. El vector **pFS-2** ha sido optimizado para el análisis nanomecánico de proteínas con baja estabilidad mecánica, empleando la **estrategia de la proteína portadora** para la **protección mecánica** de la proteína de interés, que resulta particularmente útil e indicada para el análisis de proteínas con estabilidad mecánica baja (Oroz *et al.* 2012), así como proteínas que no presentan un plegamiento definido, como es el caso de IDPs amiloidogénicas implicadas en neurodegeneración (Hervás *et al.* 2012). Para ello, un módulo ubi (o I27, en otra variante del vector) ha sido modificado y se ha introducido un pequeño MCS oculto tras su barrera mecánica, en el que se clonará el cDNA codificante para la proteína bajo estudio (Oroz *et al.* 2012).

Con el fin de mejorar sustancialmente la toma de datos en SMFS, actualmente se están generando **nuevas versiones** de este plásmido:

1. El pFS-2 que ha sido empleado durante la tesis consta tan sólo de 6 módulos ubi (más la ubi que actúa como portadora). Se ha observado que cuanto más largas sean las poliproteínas analizadas, más exitosas son las sesiones de experimentos en el AFM en términos de número de espectros útiles. Con el fin de mejorar este punto, actualmente se ha añadido una **ubiquitina adicional** en la región N terminal de la poliproteína.
2. Como se ha discutido, en ocasiones resulta muy difícil analizar datos de proteínas que no tienen un patrón de desplegamiento definido, como es el caso de las NPs (Hervás *et*

al. 2012). Mediante el uso del pFS-2, aunque cuenta con el “marcador de inicio” que supone el desplegamiento del módulo portador (a partir del cual puede aparecer la señal de la proteína de interés), es común encontrar curvas realmente difíciles de interpretar por la alta dispersión de los datos de la proteína de interés. Para subsanar este problema, se está generando una nueva versión en la que **la molécula portadora es un módulo de cohesina** (c8C) de la escafoldina CipC de *Clostridium cellulolyticum*, con una F_u promedio aproximadamente de 350 pN, superior a la estabilidad del marcador de monomolecularidad del pFS-2 (ubi, < 200pN). Esto supondría que el pico de fuerza correspondiente al desplegamiento del módulo portador apareciese normalmente **al final del espectro fuerza-extensión**, una vez todas las ubi marcadoras hubiesen sido desplegadas, seguido **inmediatamente** de la extensión total de la proteína huésped (genere o no picos de fuerza), y no en diferentes partes partes del registro como ocurre en muchas ocasiones (**Fig. 4-11**).

Hasta la fecha se han publicado varios trabajos sobre el estudio de la **nanomecánica de NPs** mediante SMFS (Sandal *et al.* 2008; Brucalé *et al.* 2009; Dougan *et al.* 2009; Wegmann *et al.* 2011). Sin embargo, dichos estudios presentan tres **limitaciones fundamentales**. La primera de ellas es consecuencia del uso de una estrategia basada en poliproteínas estándar, donde la NP se encuentra flanqueada por módulos de proteína marcadora. Dado que las NPs analizadas son proteínas desestructuradas y no presentan una estructura definida, la señal correspondiente a su desplegamiento puede aparecer en cualquier zona del espectro, incluida la zona proximal, usualmente contaminada por interacciones inespecíficas (**Fig. 1-16**). Por otra parte, en estos trabajos tampoco se demostraba el comportamiento amiloidogénico de la NP fusionada a la poliproteína usada. Por último, no aportaban evidencias convincentes que indicasen que los datos provenían del estiramiento de moléculas individuales. Para solventar el primero de estos problemas, hemos diseñado una estrategia de protección mecánica, “**la estrategia de la proteína portadora**”. En esta estrategia, la NP se encuentra insertada dentro de una zona protegida de la fuerza en una proteína portadora con propiedades mecánicas conocidas, de tal manera que la señal de la NP **sólo aparecerá una vez la proteína portadora sea desplegada** (**Fig. 4-11**). Esta estrategia, junto con el fragmento desestructurado de N2B presente en el vector pFS-2, permitirá alejarnos de la zona problemática inicial.

Hemos aplicado la estrategia de la “proteína portadora” a varias de las NPs más relevantes, en las que ha demostrado su gran utilidad (Hervás *et al.* 2012), y se ha puesto a punto un protocolo detallado y sencillo para realizar el análisis nanomecánico usando este vector para cualquier proteína en general, y para IDPs en particular (Oroz *et al.* 2012b). Gracias al desarrollo de este vector, y su análisis mediante SMFS, hemos profundizado en detalles estructurales y en la dinámica de los primeros intermedios monoméricos que forman este tipo de proteínas (Hervás *et al.* 2012), que a su vez es crucial para obtener información sobre el mecanismo molecular de formación del componente amiloide (Platt *et al.* 2005; Jahn *et al.* 2006) y para entender la **ganancia de función tóxica** de proteínas implicadas causalmente en varias enfermedades conformacionales, tales como las enfermedades neurodegenerativas (Nagai *et al.* 2007).

Antes de llevar a cabo el riguroso análisis nanomecánico, quisimos estar completamente seguros que las NPs insertadas en la proteína portadora preservaban su comportamiento amiloidogénico, esto es, la ganancia de estructura β en el tiempo y formación de fibras amiloides. Así mismo, se quería comprobar que el plegamiento del portador no se encontraba drásticamente afectado tras introducir la NP en su interior ya que esto podría afectar a su estabilidad mecánica. Para ello, se generaron proteínas de fusión mínima (sin la poliproteína pFS-2 completa) y se realizó un completo análisis estructural, termodinámico y fibrillogénico (**Figs. 4-3 a 4-9 y Tabla 3**). En conjunto, este grupo de datos experimentales nos han llevado a obtener las siguientes conclusiones:

-Respecto al portador: aunque la estabilidad conformacional de las proteínas portadoras se encuentra reducida cuando contienen la NP huésped insertada (**Fig. 4-3**) e incluso en algunas preparaciones algunas moléculas pierden su estructura terciaria, generalmente **mantienen su estructura tridimensional y propiedades mecánicas básicas** (**Figs. 4-4, 4-5 y Tabla 2**). Esto es un **requisito imprescindible** para poder llevar a cabo un análisis riguroso mediante SMFS, puesto que el pico del desplegamiento del portador nos indica el punto en el que la proteína huésped comienza a sentir fuerza. Respecto a la posible presencia de interacciones no nativas entre el portador y la proteína huésped, estos análisis **no mostraron pruebas de contactos o interacciones** entre ambos más allá de la unión covalente de la cadena polipeptídica. Esto descarta la posibilidad de contactos artefactuales y por tanto, una posible adquisición de estructura inducida en la NP cuando se inserta en el portador, o *viceversa*.

- Respecto a las proteínas huéspedes: sorprendentemente, las NPs estudiadas parecen comportarse de forma similar cuando se encuentran albergadas en el interior de la proteína portadora y cuando se encuentran aisladas, en particular en el caso de α -syn y Sup35NM, puesto que son las únicas que hemos podido comparar (para todos los parámetros analizados) con los monómeros aislados. Por tanto, **la proteína portadora no parece afectar el comportamiento amiloidogénico de las diferentes NPs**, aunque presumiblemente podría introducir restricciones considerables en su espacio conformacional. Si los extremos N y C terminales estuviesen muy próximos en la hipotética conformación estructurada de una NP dentro del portador, basándonos en la desestabilización que sufren proteínas nativas tras la reducción de enlaces disulfuro (Pace *et al.* 1988), el estado desplegado estaría entrópicamente desfavorecido en relación a la conformación estructurada hasta por 5 kcal/mol. Finalmente, los módulos que flanquean la proteína portadora en la poliproteína pFS-2 no parecen impedir la agregación de las NPs, aunque sí reducen la cinética de formación de fibras (**Fig. 4-9e**).

Una vez realizado el análisis estructural y de agregación/amiloidogénico de las proteínas de fusión mínima y aisladas, se llevó a cabo el **análisis nanomecánico** de las diferentes NPs mediante SMFS usando la estrategia de la proteína portadora. Los resultados presentados en esta tesis doctoral no son directamente comparables con los obtenidos de estudios anteriores, ya que no contaban con una estrategia para la detección de eventos de molécula individual como la desarrollada en este trabajo, ni con controles estructurales (es importante destacar que los resultados de SMFS presentados se correlacionan estrechamente con los controles estructurales y de agregación/fibrillogénesis realizados, como se muestra en las **Tablas 3 y 4**), ni tampoco controles para descartar posibles interacciones intermoleculares. Sin embargo, las conclusiones generales presentadas, están en concordancia con aquellas presentadas

previamente para tau y α -syn (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009; Wegmann *et al.* 2011), salvo que estos autores posiblemente estuviesen incluyendo en el análisis datos contaminados, sobre todo para el caso de α -syn. Usando esta novedosa estrategia, hemos analizado el espacio conformacional de cada una de las NPs estudiadas (péptido A β 42, α -syn, polyQs y Sup35NM, junto con sus variantes y diferentes condiciones) con un n aproximadamente de 100 moléculas (**Tabla 4**).

En este análisis se demuestra que proteínas incapaces de formar fibras amiloides, es decir, tractos de polyQ no patológicos -Q₁₉-, VAMP2, y el doble mutante F19S/L34P A β 42, no muestran polimorfismo conformacional mecánico, tal como se comprobó por SMFS. Por el contrario, proteínas con propensión a formar fibras amiloides, polyQs expandidas, Sup35NM, A β 42 y α -syn, junto con las formas familiares estudiadas, presentaron un **rico polimorfismo conformacional**. Por tanto, generalizando, hemos observado una característica común a todas las NPs analizadas: la existencia de un elevado polimorfismo conformacional, que viene representado por una distribución aleatoria en los diagramas de fuerza y extensión (**Figs. 4-12, 4-14, 4-15 y 4-16**). Dentro de este polimorfismo conformacional, se han caracterizado desde moléculas que no ofrecen resistencia al estiramiento (**confórmeros NM**) hasta moléculas cuyo estiramiento genera picos de fuerza (**confórmeros M**) con diferentes grados de estabilidad mecánica, llegando a aparecer eventos poco frecuentes con una F_u superior a los 400 pN, que han sido denominados de manera operativa, **confórmeros hM** (**Fig. 4-11**). Estos hallazgos, junto con observaciones anteriores (Popiel *et al.* 2007), fortalecen la conexión entre confórmeros M, amiloidogénesis y desarrollo de la enfermedad. De esta forma, en las mutaciones que inducen la aparición temprana de la enfermedad y aceleran el proceso de oligomerización (Chiti y Dobson 2006; Uversky 2009), la frecuencia de aparición de confórmeros M (y hM) se ve aumentada. Por el contrario, el tratamiento con el péptido inhibidor QBP1 reduce significativamente la frecuencia de aparición de confórmeros M (y hM) en polyQs expandidas, A53T α -syn y Sup35NM, mientras que este tratamiento no afectó el polimorfismo conformacional de Arc A β 42. Por otra parte, la incubación de A β 42 con SV111 dio como resultado un polimorfismo conformacional similar al encontrado en la muestra no tratada, aunque la agregación y la fibrillogénesis se vio bloqueada, de acuerdo con resultados anteriores (Arslan *et al.* 2010). Estos resultados indican que los datos analizados provienen, al menos mayoritariamente, de eventos de desplegamiento de estructuras formadas por el monómero de la NP sujeta a estudio. Es importante destacar que los resultados presentados en este trabajo proporcionan, a su vez, una fuerte evidencia de que los picos de fuerza analizados no proceden de interacciones de desanclaje proteína-punta o proteína-sustrato (mediante el análisis de F19S/L34P A β 42 y Q₁₉) o por cambios estructurales inducidos por la molécula portadora (mediante el análisis de VAMP2 y Q₁₉).

En nuestro estudio, se han tomado muestras de las conformaciones del monómero de cada NP en una ventana de tiempo de aproximadamente 30 días. Para profundizar en el mecanismo de formación de confórmeros M, futuros estudios deberían abordar la cinética del proceso. Si se aplica un **modelo secuencial** (**Fig. 4-19**), la correlación positiva que hemos detectado entre la frecuencia de aparición de confórmeros M y hM (**Tabla 4**) debería perderse a tiempos de incubación más largos. Esto es debido a que según este modelo, los confórmeros hM se forman a partir de una subpoblación del conjunto de confórmeros M por lo que la

frecuencia de confórmeros hM debería aumentar mientras que la de sus precursores M debería disminuir.

Los datos obtenidos nos sirven para especular sobre la posible naturaleza de los confórmeros NM, M y hM (como sub-clase dentro de M). El análisis de los datos indicaron **valores variables de ΔL_c y F_u** para eventos M en todas las NPs analizadas y condiciones testadas (Figs. 4-12, 4-14, 4-15 y 4-16). Cuando ambos parámetros son representados uno frente al otro se observa que **no existe correlación entre ellos** (Fig. 4-13), lo que sugiere que **no hay formación de estructuras preferenciales**. Basado en nuestro conocimiento actual sobre la mecanoestabilidad de proteínas (estructuras tipo β tienden a ser más mecanoestables que las hélices α o las conformaciones RC, (Carrión-Vázquez *et al.* 2006)), en el estado desplegado inicial de las poblaciones monoméricas de nuestras muestras según los análisis de CD y de NMR (Figs. 4-4, 4-15), y en la ganancia de estructura β a lo largo del tiempo monitorizada mediante CD, de acuerdo con el modelo convencional de hoja- β (Chiti y Dobson 2006), parece razonable suponer que la clase de **confórmeros NM corresponde a conformaciones RC** de las NPs, mientras que **la clase M corresponde a confórmeros β -estructurados**. Aunque nuestra interpretación se encuentra apoyada en la visión actual de la amiloidogénesis (Chiti y Dobson 2006), y se ha propuesto previamente en estudios anteriores (Sandal *et al.* 2008; Brucale *et al.* 2009), hay que señalar que hélices de poliprolina II (Uversky y Fink 2004), *coiled-coils* (Fiumara *et al.* 2010) y estructuras colapsadas (Vitalis *et al.* 2008) también han sido implicadas en el proceso de amiloidogénesis. Por otra parte, el análisis de las diferentes extensiones de polyQs también proporciona una pista importante sobre las posibles interacciones que mantienen los confórmeros tipo M. Independientemente de la naturaleza de la estructura precisa de estos confórmeros, el hecho de que este tipo de confórmeros esté presente en el caso de las polyQs expandidas sugiere fuertemente que las interacciones implicadas están mediadas por **enlaces de hidrógeno**, dado que es muy improbable que se den interacciones hidrofóbicas o electrostáticas en estos polipéptidos en condiciones fisiológicas.

En el caso de los priones, recientemente se han propuesto confórmeros separados por una alta barrera energética y estabilizados por fuerzas no covalentes, presumiblemente una alta densidad de enlaces de hidrógeno, con el fin de explicar la heredabilidad de las conformaciones priónicas (Wiltzius *et al.* 2009). Es plausible pensar que estas estructuras puedan contener cadenas β en una **configuración en cizalla**, en lugar de la cremallera (ver **Sección 1.3.2.2**), ya que hasta la fecha es la estructura que presenta experimentalmente una estabilidad mecánica más alta (Carrión-Vázquez *et al.* 2006; Valbuena *et al.* 2009). La existencia de confórmeros hM ha sido inducida en estudios anteriores de SMFS para proteínas de fusión que contenían polyQs, aunque los autores sugerían la formación de **estructuras colapsadas**, más que de estructuras con cadenas β en cizalla, incluso para los tractos no patológicos que se encuentran por debajo del umbral de patogenicidad (Dougan *et al.* 2009).

De forma general hemos observado una **excelente correlación** entre la **propensión a desarrollar una enfermedad neurodegenerativa**, en condiciones previamente demostradas por otros autores (Chiti y Dobson 2006; Uversky 2009) y el **polimorfismo conformacional** de las NPs estudiadas. Hemos demostrado también que este polimorfismo puede ser **alterado en ambas direcciones**, hacia confórmeros más "estructurados" por mutaciones patológicas o hacia la conformación NM por el inhibidor QBP1, y por mutaciones no fibrillogénicas. La reducción

drástica de la frecuencia de confórmeros M, incluyendo formas hM, producida por QBP1 sugiere que **confórmeros hM y/o sus precursores**, pertenecientes todos al grupo M, podrían ser buenos candidatos para representar una **hipotética causa primaria** de las enfermedades neurodegenerativas, es decir, el hipotético **intermedio inicial mal plegado**. Según los resultados presentados se postula que los confórmeros hM, al poseer una estabilidad mecánica tan alta, podrían ser intermediarios β -estructurados de la vía de amiloidogénesis y/o citotoxicidad (**Fig. 4-19**). Esta interpretación se encuentra apoyada fuertemente por trabajos anteriores de aportan evidencias directas indicativas de que los confórmeros tóxicos para polyQ expandidas son ricos en estructura tipo β (Nagai *et al.* 2007). Esta evidencia, junto con el hecho de que QBP1 bloquea la formación de este tipo de estructura (Nagai *et al.* 2007), y que además ejerce un efecto anti-neurodegenerativo *in vivo* (Popiel *et al.* 2007), nos permite hipotetizar sobre la posible estructura y papel patogénico que presentan los confórmeros hM, y M en general. La reducción drástica de la frecuencia de aparición de dichos confórmeros, incluyendo formas hM, en presencia de QBP1 sugiere que son **confórmeros β -estructurados** y además, buenos candidatos para representar el **hipotético intermedio mal plegado que desencadenaría la cascada de agregación**, asociada directamente con citotoxicidad y neurodegeneración.

Los resultados obtenidos amplían observaciones anteriores que indicaban **mecanismos moleculares comunes** en las etapas más avanzadas de amiloidogénesis, en diferentes NPs, a nivel de:

- a) oligomerización: basado en el reconocimiento de oligómeros estructuralmente similares en todas las NPs testadas por el anticuerpo conformacional antioligómero-específico **A11** (Kayed *et al.* 2003).
- b) fibrillogénesis: basado en que fibras amiloides de distintas NPs comparten una morfología y estructura similar denominada **columna cruzada β** , determinada por difracción de rayos X (Sipe y Cohen 2000; Sawaya *et al.* 2007).

A su vez, recientemente se ha demostrado un comportamiento priónico para polyQs expandidas, $A\beta$ y α -syn (Brundin *et al.* 2010). La identificación de un patrón de tendencias conformacionales común entre los monómeros de cuatro NPs representativas amplía aún más esta **visión unificadora** a las **primeras etapas del proceso de amiloidogénesis**. Además, la inhibición de la fibrillogénesis por el mismo péptido en tres de las cuatro NPs sugiere que el mecanismo de amiloidogénesis muestra **características moleculares comunes** muy similares desde el principio del proceso. El descubrimiento de estas características comunes ofrece esperanza de que un **único agente terapéutico** pueda ser capaz de **prevenir, detener o invertir el desarrollo de muchas enfermedades neurodegenerativas** derivadas de proteínas completamente diferentes en futuros ensayos farmacológicos.

En general, nuestros resultados apoyan fuertemente la “**hipótesis del cambio conformacional**” como mecanismo general (Kelly 1998), según la cual, la amiloidogénesis está precedida y desencadenada por un cambio conformacional en el precursor monomérico (Nagai y Popiel 2008). En el caso particular de las polyQs, el sistema más claro dada la presencia de un umbral de patogenicidad, la naturaleza de los cambios conformacionales que se producen durante el proceso de amiloidogénesis está sometido a un controvertido e intenso debate (Nagai y Popiel 2008; Uversky 2009; Wetzel 2010). De hecho, existen otros modelos

alternativos para explicar las enfermedades causadas por polyQs que han recibido atención en la bibliografía, tales como la "**hipótesis de la polimerización**", según la cual el cambio conformacional se induce tras la polimerización de monómeros en fibras, o mecanismos de reclutamiento como el "**modelo de rejilla lineal**" (Uversky 2009; Wetzel 2010). Sin embargo, **los datos presentados en este trabajo sugieren fuertemente que es el precursor monomérico quien sufre el cambio conformacional crítico que resulta en la generación de especies primarias tóxicas**. Además, proporcionan una evidencia de apoyo a la llamada "**hipótesis del umbral estructural**", que postula que por encima del umbral patológico, las polyQs expandidas sufren una transición estructural de RC a un confórmero rico en estructura tipo β (Trottier *et al.* 1995), y a su vez indican que dicha transición se produce en el monómero. El enfoque de molécula individual usado nos proporciona una explicación para el hecho de que en un estudio anterior no fuese detectado el cambio conformacional crítico mediante espectroscopía de NMR (Masino *et al.* 2002). Además del hecho de que en este estudio las proteínas de fusión utilizadas, glutatión S-transferasa-Q_n, no mostraron ninguna evidencia de agregación, indicador de que no se ha producido el cambio de conformación, los confórmeros hM encontrados mediante nuestra aproximación representan sólo el 7,5% o menos de las especies M detectadas. Esta fracción sería difícil de detectar incluso si todos estos confórmeros fuesen estables y formasen una única especie, cosa que no parece ocurrir, de acuerdo con la falta de correlación de los datos ΔL_c y F_u (Fig 4-13).

En base a los resultados presentados y considerando la existencia trabajos que indican la interconversión rápida entre distintos confórmeros monoméricos en NPs (Ferreon *et al.* 2010), se propone que una vez formados, los confórmeros hM son susceptibles de quedar **atrapados cinéticamente**, debido a las altas barreras de energía que presentan para el proceso de desplegamiento. Este hecho haría que pudiesen **inhibir mecánicamente la maquinaria de procesamiento proteico** de la célula (principalmente proteasoma y chaperonas), como anteriormente se ha postulado (Carrión-Vázquez *et al.* 2006). Dicho efecto ralentizaría el procesamiento de las NPs en la célula, lo que desequilibraría la **proteostasis** celular mediante el aumento de la concentración citosólica de confórmeros hM. Este desequilibrio podría afectar a distintos procesos celulares y en última instancia, conducir a la formación de oligómeros tóxicos y fibras amiloides (Fig. 4-19). Esta "**hipótesis de inhibición mecánica**" se ve sustentada por cuatro líneas de descubrimientos:

1) Actualmente se sabe que las enfermedades neurodegenerativas basadas en deposición de amiloide tienen un **inicio tardío y que durante el envejecimiento disminuye la eficiencia de la maquinaria de procesamiento proteico celular**, como el proteasoma (Keller *et al.* 2000).

2) *In vivo*, la actividad proteasomal se encuentra **transitoriamente alterada** cuando se expresa el N-terminal de Huntingtina con trectos de polyQs expandidos patogénicos (Ortega *et al.* 2010).

3) Recientemente ha sido demostrado que las AAA+ ATPasas, propias de la maquinaria de degradación proteica, **despliegan a sus sustratos** antes de ser proteolizados **de manera mecánica**, generando fuerzas relativamente bajas, 20-30 pN, en una geometría de estiramiento aparentemente similar a la de los experimentos de SMFS y una tasa de carga calculada de 0,15 pN/s (Aubin-Tam *et al.* 2011; Maillard *et al.* 2011).

4) **El funcionamiento conjunto de chaperonas moleculares con chaperoninas** (Cuellar *et al.* 2008), juega un papel clave en la prevención del mal plegamiento, y promoviendo el ensamblaje de proteínas con expansiones patológicas de polyQs en oligómeros no tóxicos para la célula (Behrends *et al.* 2006; Kitamura *et al.* 2006; Tam *et al.* 2006; Tam *et al.* 2009).

Alternativamente, los conforméromos tóxicos de las NPs podrían afectar a diferentes procesos celulares **secuestrando otras IDPs implicadas en funciones celulares importantes** (Olzscha *et al.* 2011), al proceso normal de **autofagia lisosomal** (Lee 2009) o **incrementar el estrés oxidativo celular**, relacionado causalmente con el mal plegamiento proteico (Andersen 2004). También podría ocurrir que, alternativamente, los conforméromos hM pudiesen representar especies off-pathway, es decir, subproductos fuera de la vía de amiloidogénesis y citotoxicidad. En este hipotético caso las especies tóxicas corresponderían a otra parte de las especies restantes de la población de conforméromos M.

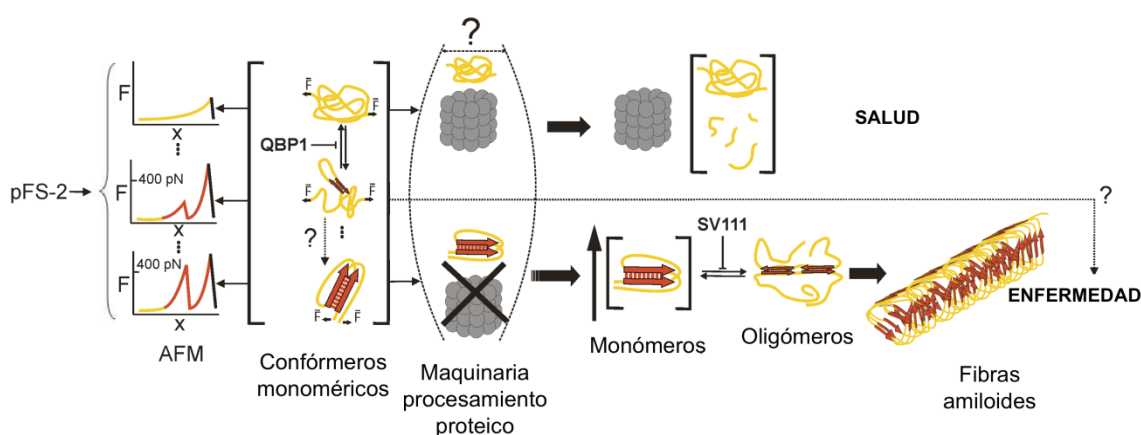


Figura 4-19. Hipótesis mecánica y posible relación con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas. El desarrollo del vector pFS-2 (Oroz *et al.* 2012), ha permitido observar un alto grado de polimorfismo conformacional en diferentes NPs, que comprende desde conformaciones sin estabilidad mecánica detectable (conforméromos NM, que no presentan picos de fuerza detectables en SMFS) a conformaciones M (con al menos un pico de fuerza por molécula). Esta última clase incluye una pequeña parte de conforméromos hM (con al menos un pico de fuerza con $F_u \geq 400$ pN). Es razonable asumir que tanto conforméromos M como hM corresponden a conforméromos β -estructurados. Evidencias basadas en técnicas de fluorescencia de molécula individual indican que los diferentes conforméromos se encuentran en un equilibrio altamente dinámico (Ferreon *et al.* 2010), sin embargo, una vez formados los conforméromos hM podrían quedar atrapados cinéticamente dada su alta barrera energética para el proceso de desplegamiento. En base a los datos obtenidos, y diferentes premisas, se propone un hipotético mecanismo plausible de citotoxicidad en el que los conforméromos hM bloquearían mecánicamente la maquinaria de procesamiento proteico en la célula, lo que llevaría a un aumento en su concentración citosólica que, hipotéticamente, afectaría a múltiples procesos celulares, resultando finalmente en la formación de oligómeros tóxicos y fibras amiloides. Estos conforméromos hM podrían proceder secuencialmente de intermedios β -estructurados menos tóxicos (*on-pathway*) o podrían desencadenar la enfermedad a través de una vía distinta de la aquí propuesta. Alternativamente, los conforméromos hM podrían representar subproductos de la vía amiloidogénica/citotóxica cinéticamente atrapados. Los pasos bloqueados por los dos inhibidores peptídicos utilizados en esta tesis se indican en el esquema: QBP1 bloquea el cambio conformacional del monómero y desplaza el putativo equilibrio hacia el conforméromo RC, lo que se interrumpe la cascada patogénica en sus primeras etapas, mientras que SV111 inhibe la oligomerización de los β -hairpin formados por monómeros de A β 42 (Arslan *et al.* 2010).

En **conclusión**, en los últimos años la **biofísica de moléculas individuales**, junto con el desarrollo de **nuevas estrategias de análisis mediante ingeniería de proteínas**, ha demostrado ser muy útil en el análisis estructural de sistemas complejos, como es el caso de las **IDPs** (Ferreon *et al.* 2010; Hervás *et al.* 2012). En combinación con la información obtenida de las aproximaciones poblacionales, las **técnicas MMI** permiten obtener una visión más profunda y detallada de procesos celulares complejos tales como la neurodegeneración (Hervás *et al.* 2012). **Los resultados mostrados en la presente tesis doctoral muestran una clara correlación entre el polimorfismo conformacional de las NPs estudiadas y su neurotoxicidad.** Se concluye que los eventos hM representan confórmeros estructurados en la ruta de fibrilación/toxicidad y que esos confórmeros, o sus precursores M, podrían estar directamente relacionados con el desarrollo de la patología. La aproximación expuesta, basada en el nuevo **vector pFS-2** y la **estrategia de la “proteína portadora”**, abre la puerta a la comprensión del **mecanismo molecular de la amiloidogénesis**. En base a los resultados obtenidos, proponemos el término auto-explicativo **"proteinosclerosis"** para referirnos colectivamente a amiloidosis neurodegenerativas. En este contexto, los confórmeros hM (o sus precursores más tempranos si asumimos una vía secuencial), constituyen **dianas farmacológicas ideales y biomarcadores** de propensión a desarrollar estas enfermedades fatales. Además, el **descubrimiento de la actividad promiscua del péptido QBP1**, junto con el polimorfismo conformacional presente en las NPs, indica que existen características comunes en todas ellas, lo que posibilitaría el desarrollo de una **estrategia terapéutica basada en un solo fármaco** que pudiese ser usado para **tratar distintas enfermedades neurodegenerativas**.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

A continuación paso a enumerar las conclusiones más representativas derivadas del trabajo realizado durante la presente tesis doctoral, que se corresponden con los **Objetivos** propuestos inicialmente:

- I. Hemos desarrollado un **vector de expresión**, basado en la familia colectivamente denominada **pFS**, que presenta una serie de ventajas que lo hacen un sistema versátil e idóneo para el análisis nanomecánico **inequívoco**, a nivel de molécula individual, de proteínas con estabilidad mecánica muy baja o que presenten **polimorfismo conformacional**. Esta variante, denominada pFS-2, está basada en la **estrategia de la proteína portadora** y es **ideal para el análisis de IDPs amiloidogénicas**.
- II. Hemos validado esta estrategia, demostrando mediante técnicas estructurales de alta y media resolución, NMR, CD y TEM, así como mediante técnicas espectrofotométricas, que la **estrategia portadora** usada para el análisis de las proteínas neurotóxicas **no introduce modificaciones artefactuales** en la proteína bajo estudio (conservado sus propiedades amiloidogénicas) ni en la proteína que actúa como portadora.
- III. Hemos demostrado que las proteínas neurotóxicas más representativas usadas en este trabajo, presentan un elevado **polimorfismo conformacional mecánico**, incluyendo confórmeros con una estabilidad mecánica superior a los 400 pN, a los que hemos denominado **hiper-mecanoestables**, sugiriendo un **mecanismo molecular común** -a nivel de monómero- en el comienzo de la cascada de agregación / neurodegeneración. Algunas de estos confórmeros presentan **la mayor estabilidad mecánica descrita hasta la fecha** para una proteína.
- IV. El polimorfismo conformacional puede ser modulado en dos sentidos: Las **formas familiares** de enfermedades analizadas incrementan la propensión de formar confórmeros mecanoestables e hiper-mecanoestables.
- V. El péptido **inhibidor QBP1 reduce drásticamente** la frecuencia de dichos confórmeros para expansiones de polyQ, α -syn y Sup35NM, pero no para el caso del péptido A β 42.
- VI. Nuestros resultados favorecen la llamada hipótesis del **“cambio conformacional”** en el mecanismo de formación de las fibras amiloides, según la cual es una **transición estructural en el monómero** (cambio que resulta en la generación de las primeras especies tóxicas) la que desencadena el proceso de agregación, asociado a la muerte neuronal, hasta la formación de las **fibras amiloides**.

- VII. Postulamos **una hipótesis mecánica**, en la que los confórmers hiper-mecanoestables, o sus precursores estructurales, podrían estar relacionados con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, mediante un proceso de **inhibición o bloqueo mecánico** de las **maquinarias de procesamiento proteico** celulares (proteasoma y chaperonas). Proponemos estos confórmers como posibles **dianas terapéuticas** y **biomarcadores** tempranos de enfermedades neurodegenerativas.
- VIII. Hemos puesto a punto un **protocolo detallado y sencillo** para realizar el análisis nanomecánico de **IDPs** en general, y **proteínas neurotóxicas** amiloidogénicas en particular, usando la estrategia de la proteína portadora de protección mecánica, un procedimiento que, en principio, puede ser utilizado para el análisis nanomecánico de **cualquier proteína** de interés.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

- Ainavarapu, S. R., J. Brujic, et al. (2007). "Contour length and refolding rate of a small protein controlled by engineered disulfide bonds." *Biophys J* 92(1): 225-233.
- Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nat Med* 10 Suppl: S18-25.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." *Science* 181(4096): 223-230.
- Armen, R. S., B. M. Bernard, et al. (2005). "Characterization of a possible amyloidogenic precursor in glutamine-repeat neurodegenerative diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38): 13433-13438.
- Arslan, P. E., V. K. Mulligan, et al. (2010). "Conversion of Abeta42 into a folded soluble native-like protein using a semi-random library of amphipathic helices." *J Mol Biol* 396(5): 1284-1294.
- Aubin-Tam, M. E., A. O. Olivares, et al. (2011). "Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine." *Cell* 145(2): 257-267.
- Bach, D. and D. Chapman (1980). "Biological Microcalorimetry." Beezer, A.E., Ed. Academic Press, London.: 265.
- Baldwin, R. L. (1996). "On-pathway versus off-pathway folding intermediates." *Fold Des* 1(1): R1-8.
- Bates, G. (1996). "Expanded glutamines and neurodegeneration--a gain of insight." *Bioessays* 18(3): 175-178.
- Bauer, P. O., A. Goswami, et al. (2010). "Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein." *Nat Biotechnol* 28(3): 256-263.
- Baumgartner, W., P. Hinterdorfer, et al. (2000). "Cadherin interaction probed by atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4005-4010.
- Becktel, W. J. and J. A. Schellman (1987). "Protein stability curves." *Biopolymers* 26(11): 1859-1877.
- Behrends, C., C. A. Langer, et al. (2006). "Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers." *Mol Cell* 23(6): 887-897.
- Bell, G. I. (1978). "Models for the specific adhesion of cells to cells." *Science* 200(4342): 618-627.
- Bohm, G., R. Muhr, et al. (1992). "Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks." *Protein Eng* 5(3): 191-195.
- Brahms, S. and J. Brahms (1980). "Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism." *J Mol Biol* 138(2): 149-178.
- Brucale, M., M. Sandal, et al. (2009). "Pathogenic mutations shift the equilibria of alpha-synuclein single molecules towards structured conformers." *Chembiochem* 10(1): 176-183.
- Bruix, M., M. Ribo, et al. (2008). "Destabilizing mutations alter the hydrogen exchange mechanism in ribonuclease A." *Biophys J* 94(6): 2297-2305.
- Brundin, P., R. Melki, et al. (2010). "Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4): 301-307.
- Bruylants, G., J. Wouters, et al. (2005). "Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design." *Curr Med Chem* 12(17): 2011-2020.
- Bussell, R., Jr. and D. Eliezer (2001). "Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein." *J Biol Chem* 276(49): 45996-46003.
- Bustamante, C., Y. R. Chemla, et al. (2004). "Mechanical processes in biochemistry." *Annu Rev Biochem* 73: 705-748.
- Bustamante, C., J. C. Macosko, et al. (2000). "Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2): 130-136.

- Bustamante, C., J. F. Marko, et al. (1994). "Entropic elasticity of lambda-phage DNA." *Science* 265(5178): 1599-1600.
- Calakos, N., M. K. Bennett, et al. (1994). "Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking." *Science* 263(5150): 1146-1149.
- Carrión-Vázquez, M., H. Li, et al. (2003). "The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent." *Nat Struct Biol* 10(9): 738-743.
- Carrión-Vázquez M, O. A., Díez H, Hervás R, Oroz J, Fernández J, Marínez-Martín D (2006). "Protein nanomechanics—as studied by AFM single-molecule force spectroscopy." *Advanced techniques in biophysics*. Springer, Heidelberg: 163–245.
- Carrión-Vázquez, M., A. F. Oberhauser, et al. (2006). "Protein nanomechanics—as studied by AFM single-molecule force spectroscopy." *Advanced techniques in biophysics*. Springer, Heidelberg: 163–245.
- Carrión-Vázquez, M., A. F. Oberhauser, et al. (1999). "Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3694-3699.
- Chen, B., K. R. Thurber, et al. (2009). "Measurement of amyloid fibril mass-per-length by tilted-beam transmission electron microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34): 14339-14344.
- Chiti, F. and C. M. Dobson (2006). "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease." *Annu Rev Biochem* 75: 333-366.
- Conway, K. A., J. D. Harper, et al. (1998). "Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease." *Nat Med* 4(11): 1318-1320.
- Cuellar, J., J. Martin-Benito, et al. (2008). "The structure of CCT-Hsc70 NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin." *Nat Struct Mol Biol* 15(8): 858-864.
- de Pablo, P. J., I. A. Schaap, et al. (2003). "Deformation and collapse of microtubules on the nanometer scale." *Phys Rev Lett* 91(9): 098101.
- Di Stefano, D. L. and A. J. Wand (1987). "Two-dimensional ¹H NMR study of human ubiquitin: a main chain directed assignment and structure analysis." *Biochemistry* 26(23): 7272-7281.
- Dietz, H. and M. Rief (2006). "Protein structure by mechanical triangulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1244-1247.
- Dill, K. A. and H. S. Chan (1997). "From Levinthal to pathways to funnels." *Nat Struct Biol* 4(1): 10-19.
- Dougan, L., J. Li, et al. (2009). "Single homopolypeptide chains collapse into mechanically rigid conformations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31): 12605-12610.
- Dunker, A. K., C. J. Brown, et al. (2002). "Intrinsic disorder and protein function." *Biochemistry* 41(21): 6573-6582.
- Dunker, A. K., Z. Obradovic, et al. (2000b). "Intrinsic protein disorder in complete genomes." *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 11: 161-171.
- Evans, E. and K. Ritchie (1997). "Dynamic strength of molecular adhesion bonds." *Biophys J* 72(4): 1541-1555.
- Fernandez, J. M. and H. Li (2004). "Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein." *Science* 303(5664): 1674-1678.
- Ferraro, D. M., D. J. Ferraro, et al. (2006). "Structures of ubiquitin insertion mutants support site-specific reflex response to insertions hypothesis." *J Mol Biol* 359(2): 390-402.
- Ferraro, D. M., E. K. Hope, et al. (2005). "Site-specific reflex response of ubiquitin to loop insertions." *J Mol Biol* 352(3): 575-584.
- Ferraro, D. M. and A. D. Robertson (2008). "Predicting the magnitude of the reflex response to insertions in ubiquitin." *J Mol Biol* 375(3): 764-772.
- Ferreon, A. C., C. R. Moran, et al. (2010). "Single-molecule fluorescence studies of intrinsically disordered proteins." *Methods Enzymol* 472: 179-204.

- Finley, D., B. Bartel, et al. (1989). "The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis." *Nature* 338(6214): 394-401.
- Fiumara, F., L. Fioriti, et al. (2010). "Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and PolyQ proteins." *Cell* 143(7): 1121-1135.
- Florin, E. L., M. Rief, et al. (1995). "Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope." *Biosens Bioelectron* 10: 895-901.
- Frieden, C. (2007). "Protein aggregation processes: In search of the mechanism." *Protein Sci* 16(11): 2334-2344.
- Fuxreiter, M., I. Simon, et al. (2004). "Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins." *J Mol Biol* 338(5): 1015-1026.
- Gallagher, S. R. (2001). "One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions." *Curr Protoc Protein Sci Chapter 10: Unit 10 13*.
- Garcia-Manyes, S., J. Brujic, et al. (2007). "Force-clamp spectroscopy of single-protein monomers reveals the individual unfolding and folding pathways of I27 and ubiquitin." *Biophys J* 93(7): 2436-2446.
- Garcia-Manyes, S., L. Dougan, et al. (2009). "Direct observation of an ensemble of stable collapsed states in the mechanical folding of ubiquitin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(26): 10534-10539.
- Gómez-Moreno, C. and J. Sancho (2003). "Estructura de proteínas." Ariel Ciencia, Barcelona.
- Grandbois, M., M. Beyer, et al. (1999). "How strong is a covalent bond?" *Science* 283(5408): 1727-1730.
- Grishaev, A., V. Tugarinov, et al. (2008). "Refined solution structure of the 82-kDa enzyme malate synthase G from joint NMR and synchrotron SAXS restraints." *J Biomol NMR* 40(2): 95-106.
- Grishaev, A., J. Wu, et al. (2005). "Refinement of multidomain protein structures by combination of solution small-angle X-ray scattering and NMR data." *J Am Chem Soc* 127(47): 16621-16628.
- Gsponer, J., H. Hopearuoho, et al. (2006). "Geometry, energetics, and dynamics of hydrogen bonds in proteins: structural information derived from NMR scalar couplings." *J Am Chem Soc* 128(47): 15127-15135.
- Hazzard, J., T. C. Sudhof, et al. (1999). "NMR analysis of the structure of synaptobrevin and of its interaction with syntaxin." *J Biomol NMR* 14(3): 203-207.
- Hervás, R., J. Oroz, et al. (2012). "Common features at the start of the neurodegeneration cascade." *PLoS Biol* 10(5): e1001335.
- Hinault, M. P., A. Ben-Zvi, et al. (2006). "Chaperones and proteases: cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging." *J Mol Neurosci* 30(3): 249-265.
- Hinterdorfer, P. (2002). "Molecular recognition studies using the atomic force microscope." *Methods Cell Biol* 68: 115-139.
- Hossain, M. D., S. Furuike, et al. (2006). "The rotor tip inside a bearing of a thermophilic F1-ATPase is dispensable for torque generation." *Biophys J* 90(11): 4195-4203.
- Hou, L., H. Shao, et al. (2004). "Solution NMR studies of the A beta(1-40) and A beta(1-42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation." *J Am Chem Soc* 126(7): 1992-2005.
- Humphrey, W., A. Dalke, et al. (1996). "VMD: visual molecular dynamics." *J Mol Graph* 14(1): 33-38, 27-38.
- Improta, S., A. S. Politou, et al. (1996). "Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity." *Structure* 4(3): 323-337.
- Israelachvili, J. N. (1998). "Intermolecular and surface forces." Academic Press, Londres.
- Jahn, T. R., M. J. Parker, et al. (2006). "Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate." *Nat Struct Mol Biol* 13(3): 195-201.

- Janovjak, H., M. Kessler, et al. (2003). "Unfolding pathways of native bacteriorhodopsin depend on temperature." *EMBO J* 22(19): 5220-5229.
- Junker, J. P., F. Ziegler, et al. (2009). "Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules." *Science* 323(5914): 633-637.
- Kayed, R., E. Head, et al. (2003). "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis." *Science* 300(5618): 486-489.
- Keller, J. N., K. B. Hanni, et al. (2000). "Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress." *Mech Ageing Dev* 113(1): 61-70.
- Kellermayer, M. S., A. Karsai, et al. (2006). "Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules." *Biophys J* 91(7): 2665-2677.
- Kelly, J. W. (1998). "The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways." *Curr Opin Struct Biol* 8(1): 101-106.
- Kessler, M. and H. E. Gaub (2006). "Unfolding barriers in bacteriorhodopsin probed from the cytoplasmic and the extracellular side by AFM." *Structure* 14(3): 521-527.
- Kitamura, A., H. Kubota, et al. (2006). "Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state." *Nat Cell Biol* 8(10): 1163-1170.
- Krishna, M. M., Y. Lin, et al. (2004). "Protein misfolding: optional barriers, misfolded intermediates, and pathway heterogeneity." *J Mol Biol* 343(4): 1095-1109.
- LaFerla, F. M., K. N. Green, et al. (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* 8(7): 499-509.
- Laurents, D. V., P. M. Gorman, et al. (2005). "Alzheimer's Abeta40 studied by NMR at low pH reveals that sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS) binds and promotes beta-ball oligomerization." *J Biol Chem* 280(5): 3675-3685.
- Leake, M. C., A. Grutzner, et al. (2006). "Mechanical properties of cardiac titin's N2B-region by single-molecule atomic force spectroscopy." *J Struct Biol* 155(2): 263-272.
- Lee, G., K. Abdi, et al. (2006). "Nanospring behaviour of ankyrin repeats." *Nature* 440(7081): 246-249.
- Lee, J. A. (2009). "Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin." *BMB Rep* 42(6): 324-330.
- Levinthal, C. (1968). "Are there pathways for protein folding?" *J. Chim. Phys* 65: 44-45.
- Li, H., W. A. Linke, et al. (2002). "Reverse engineering of the giant muscle protein titin." *Nature* 418(6901): 998-1002.
- Li, H., A. F. Oberhauser, et al. (2001). "Multiple conformations of PEVK proteins detected by single-molecule techniques." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10682-10686.
- Li, X., P. Romero, et al. (1999). "Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions." *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 10: 30-40.
- Liu, J., L. A. Campos, et al. (2012). "Exploring one-state downhill protein folding in single molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(1): 179-184.
- Liversage, A. D., D. Holmes, et al. (2001). "Titin and the sarcomere symmetry paradox." *J Mol Biol* 305(3): 401-409.
- Ma, L., M. Xu, et al. (2009). "Naturally occurring mutations alter the stability of polycystin-1 polycystic kidney disease (PKD) domains." *J Biol Chem* 284(47): 32942-32949.
- Maillard, R. A., G. Chistol, et al. (2011). "ClpX(P) generates mechanical force to unfold and translocate its protein substrates." *Cell* 145(3): 459-469.
- Markley, J. L., A. Bax, et al. (1998). "Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids." *J Mol Biol* 280(5): 933-952.
- Marko, J. F. and E. D. Siggia (1995). "Stretching DNA." *Macromolecules* 28: 8759-8770.
- Masino, L., G. Kelly, et al. (2002). "Solution structure of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins." *FEBS Lett* 513(2-3): 267-272.
- Matsunaga, Y. and T. Komatsuzaki (2004). "Protein Folding Dynamics: Ergodic Behavior in Principal Component Space." *AIP CONFERENCE PROCEEDINGS* 708: 342-343.

- Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* 260(3): 289-298.
- Moreno-Herrero, F., J. Colchero, et al. (2004). "Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 69(3 Pt 1): 031915.
- Moreno-Herrero, F., P. J. de Pablo, et al. (2002). "Scanning force microscopy jumping and tapping modes in liquids." *Applied Phys Let* 81: 2620-2622.
- Muller, D. J., D. Fotiadis, et al. (1999). "Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope." *Biophys J* 76(2): 1101-1111.
- Muller, D. J., G. M. Hand, et al. (2002). "Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions." *EMBO J* 21(14): 3598-3607.
- Muñoz, V. (2007). "Conformational dynamics and ensembles in protein folding." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36: 395-412.
- Nagai, Y., T. Inui, et al. (2007). "A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein." *Nat Struct Mol Biol* 14(4): 332-340.
- Nagai, Y., O. Onodera, et al. (1999). "Expanded polyglutamine domain proteins bind neurofilament and alter the neurofilament network." *Exp Neurol* 155(2): 195-203.
- Nagai, Y. and H. A. Popiel (2008). "Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: exposed beta-sheet hypothesis." *Curr Pharm Des* 14(30): 3267-3279.
- Nagai, Y., T. Tucker, et al. (2000). "Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening." *J Biol Chem* 275(14): 10437-10442.
- Ng, S. P., R. W. Rounsevell, et al. (2005). "Mechanical unfolding of TNfn3: the unfolding pathway of a fnIII domain probed by protein engineering, AFM and MD simulation." *J Mol Biol* 350(4): 776-789.
- Oberhauser, A. F. and M. Carrión-Vázquez (2008). "Mechanical biochemistry of proteins one molecule at a time." *J Biol Chem* 283(11): 6617-6621.
- Obradovic, Z., K. Peng, et al. (2003). "Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence." *Proteins* 53 Suppl 6: 566-572.
- Olzscha, H., S. M. Schermann, et al. (2011). "Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions." *Cell* 144(1): 67-78.
- Onuchic, J. N., N. D. Socci, et al. (1996). "Protein folding funnels: the nature of the transition state ensemble." *Fold Des* 1(6): 441-450.
- Oroz, J., R. Hervás, et al. (2012). "Unequivocal single-molecule force spectroscopy of proteins by AFM using pFS vectors." *Biophys J* 102(3): 682-690.
- Oroz, J., R. Hervás, et al. (2012b). "Unequivocal single-molecule force spectroscopy of intrinsically disordered proteins." *Methods Mol Biol* 896: 71-87.
- Oroz, J., A. Valbuena, et al. (2011). "Nanomechanics of the cadherin ectodomain: "canalization" by Ca²⁺ binding results in a new mechanical element." *J Biol Chem* 286(11): 9405-9418.
- Ortega, Z., M. Diaz-Hernandez, et al. (2010). "Acute polyglutamine expression in inducible mouse model unravels ubiquitin/proteasome system impairment and permanent recovery attributable to aggregate formation." *J Neurosci* 30(10): 3675-3688.
- Pace, C., B. A. Shirley, et al. (1989). "Protein structure: a practical approach." In: Creighton TE (ed) . IRL Press, Oxford University Press, Nueva York: 311-329.
- Pace, C. N., G. R. Grimsley, et al. (1988). "Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds." *J Biol Chem* 263(24): 11820-11825.
- Pace, C. N. and J. M. Scholtz (1997). "Measuring the conformational stability of a protein." In: Creighton T. E, editor. Protein structure. Oxford: Oxford University Press: 253-259.
- Perutz, M. F., T. Johnson, et al. (1994). "Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5355-5358.

- Piotto, M., V. Saudek, et al. (1992). "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions." *J Biomol NMR* 2(6): 661-665.
- Platt, G. W., V. J. McParland, et al. (2005). "Dynamics in the unfolded state of beta2-microglobulin studied by NMR." *J Mol Biol* 346(1): 279-294.
- Popiel, H. A., J. R. Burke, et al. (2011). "The Aggregation Inhibitor Peptide QBP1 as a Therapeutic Molecule for the Polyglutamine Neurodegenerative Diseases." *J Amino Acids* 2011: 265084.
- Popiel, H. A., Y. Nagai, et al. (2007). "Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in vivo." *Mol Ther* 15(2): 303-309.
- Pradeep, L., H. C. Shin, et al. (2006). "Correlation of folding kinetics with the number and isomerization states of prolines in three homologous proteins of the RNase family." *FEBS Lett* 580(21): 5029-5032.
- Privalov, P. L. and V. V. Filimonov (1978). "Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding." *J Mol Biol* 122(4): 447-464.
- Privalov, P. L. and N. N. Khechinashvili (1974). "A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study." *J Mol Biol* 86(3): 665-684.
- Radley, T. L., A. I. Markowska, et al. (2003). "Allosteric switching by mutually exclusive folding of protein domains." *J Mol Biol* 332(3): 529-536.
- Rief, M., M. Gautel, et al. (1997). "Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM." *Science* 276(5315): 1109-1112.
- Roberts, G. C. K. (1993). "NMR of macromolecules. A practical approach." IRL Press, Oxford University Press, Nueva York.
- Sambashivan, S., Y. Liu, et al. (2005). "Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure." *Nature* 437(7056): 266-269.
- Sambrook, J. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory manual. ." 2nd Ed., Cold Spring Harbor.
- Sandal, M., F. Valle, et al. (2008). "Conformational equilibria in monomeric alpha-synuclein at the single-molecule level." *PLoS Biol* 6(1): e6.
- Santoro, M. M. and D. W. Bolen (1988). "Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants." *Biochemistry* 27(21): 8063-8068.
- Sarkar, A., S. Caamano, et al. (2005). "The elasticity of individual titin PEVK exons measured by single molecule atomic force microscopy." *J Biol Chem* 280(8): 6261-6264.
- Sarkar, A., S. Caamano, et al. (2007). "The mechanical fingerprint of a parallel polyprotein dimer." *Biophys J* 92(4): L36-38.
- Sarkar, A., R. B. Robertson, et al. (2004). "Simultaneous atomic force microscope and fluorescence measurements of protein unfolding using a calibrated evanescent wave." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(35): 12882-12886.
- Sato, T., M. Esaki, et al. (2005). "Comparison of the protein-unfolding pathways between mitochondrial protein import and atomic-force microscopy measurements." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 17999-18004.
- Sawaya, M. R., S. Sambashivan, et al. (2007). "Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers." *Nature* 447(7143): 453-457.
- Schaap, I. A., P. J. de Pablo, et al. (2004). "Resolving the molecular structure of microtubules under physiological conditions with scanning force microscopy." *Eur Biophys J* 33(5): 462-467.
- Schlierf, M., F. Berkemeier, et al. (2007). "Direct observation of active protein folding using lock-in force spectroscopy." *Biophys J* 93(11): 3989-3998.
- Sipe, J. D. and A. S. Cohen (2000). "Review: history of the amyloid fibril." *J Struct Biol* 130(2-3): 88-98.

- Steward, A., J. L. Toca-Herrera, et al. (2002). "Versatile cloning system for construction of multimeric proteins for use in atomic force microscopy." *Protein Sci* 11(9): 2179-2183.
- Tam, S., R. Geller, et al. (2006). "The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions." *Nat Cell Biol* 8(10): 1155-1162.
- Tam, S., C. Spiess, et al. (2009). "The chaperonin TRiC blocks a huntingtin sequence element that promotes the conformational switch to aggregation." *Nat Struct Mol Biol* 16(12): 1279-1285.
- Tanaka, M., I. Morishima, et al. (2001). "Intra- and intermolecular beta-pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases." *J Biol Chem* 276(48): 45470-45475.
- Teng, P. K. and D. Eisenberg (2009). "Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state." *Protein Eng Des Sel* 22(8): 531-536.
- Tomita, K., H. A. Popiel, et al. (2009). "Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1." *Bioorg Med Chem* 17(3): 1259-1263.
- Tompa, P. (2003). "Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion." *Bioessays* 25(9): 847-855.
- Trottier, Y., Y. Lutz, et al. (1995). "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias." *Nature* 378(6555): 403-406.
- Tugarinov, V., W. Y. Choy, et al. (2005). "Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3): 622-627.
- Ulmer, T. S., A. Bax, et al. (2005). "Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein." *J Biol Chem* 280(10): 9595-9603.
- Uversky, V. (2009). "Intrinsic Disorder in Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases." In: Ovádi J, Orosz F, editors. *Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases*, Springer-Verlag: 21-75.
- Uversky, V. N. and A. K. Dunker (2010). "Understanding protein non-folding." *Biochim Biophys Acta* 1804(6): 1231-1264.
- Uversky, V. N. and A. L. Fink (2004). "Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded." *Biochim Biophys Acta* 1698(2): 131-153.
- Uversky, V. N., C. J. Oldfield, et al. (2005). "Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling." *J Mol Recognit* 18(5): 343-384.
- Valbuena, A., J. Oroz, et al. (2009). "On the remarkable mechanostability of scaffoldins and the mechanical clamp motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13791-13796.
- Valbuena, A., J. Oroz, et al. (2007). "Quasi-simultaneous imaging/pulling analysis of single polypeptide molecules by atomic force microscopy." *Rev Sci Instrum* 78(11): 113707.
- Valpuesta, J. M., J. Martin-Benito, et al. (2002). "Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT." *FEBS Lett* 529(1): 11-16.
- Varea, J., B. Monterroso, et al. (2004). "Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against pneumococci." *J Biol Chem* 279(42): 43697-43707.
- Varea, J., J. L. Saiz, et al. (2000). "Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase?" *J Biol Chem* 275(35): 26842-26855.
- Venkatraman, P., R. Wetzel, et al. (2004). "Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins." *Mol Cell* 14(1): 95-104.
- Vitalis, A., X. Wang, et al. (2008). "Atomistic simulations of the effects of polyglutamine chain length and solvent quality on conformational equilibria and spontaneous homodimerization." *J Mol Biol* 384(1): 279-297.
- Wang, L., E. V. Rivera, et al. (2005). "Loop entropy and cytochrome c stability." *J Mol Biol* 353(3): 719-729.

- Ward, J. J., J. S. Sodhi, et al. (2004). "Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life." *J Mol Biol* 337(3): 635-645.
- Watanabe, K., P. Nair, et al. (2002). "Molecular mechanics of cardiac titin's PEVK and N2B spring elements." *J Biol Chem* 277(13): 11549-11558.
- Wegmann, S., J. Scholer, et al. (2011). "Competing interactions stabilize pro- and anti-aggregant conformations of human Tau." *J Biol Chem* 286(23): 20512-20524.
- Weinreb, P. H., W. Zhen, et al. (1996). "NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded." *Biochemistry* 35(43): 13709-13715.
- Weisel, J. W., H. Shuman, et al. (2003). "Protein-protein unbinding induced by force: single-molecule studies." *Curr Opin Struct Biol* 13(2): 227-235.
- Wen, J. D., L. Lancaster, et al. (2008). "Following translation by single ribosomes one codon at a time." *Nature* 452(7187): 598-603.
- Went, H. M., C. G. Benitez-Cardoza, et al. (2004). "Is an intermediate state populated on the folding pathway of ubiquitin?" *FEBS Lett* 567(2-3): 333-338.
- Wetzel, R. (2010). "Misfolding and aggregation in huntington disease and other expanded polyglutamine repeat diseases. ." In: Ramírez-Alvarado M, Kelly JW, Dobson CM, editors. *Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies*. John Wiley & Sons: 305-324.
- Wiita, A. P., R. Perez-Jimenez, et al. (2007). "Probing the chemistry of thioredoxin catalysis with force." *Nature* 450(7166): 124-127.
- Williams, D. B. and B. Carter (1996a). "Transmission Electron Microscopy, Basics I." Plenum Press, New York. Chapter 1,2,10.
- Williams, D. B. and B. Carter (1996b). "Transmission Electron Microscopy , Difraccion II." Plenum Press, New York.
- Wiltzius, J. J., M. Landau, et al. (2009). "Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance." *Nat Struct Mol Biol* 16(9): 973-978.
- Wintrode, P. L., G. I. Makhatadze, et al. (1994). "Thermodynamics of ubiquitin unfolding." *Proteins* 18(3): 246-253.
- Wishart, D. S., C. G. Bigam, et al. (1995). "¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects." *J Biomol NMR* 5(1): 67-81.
- Wurth, C., N. K. Guimard, et al. (2002). "Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis." *J Mol Biol* 319(5): 1279-1290.
- Wüthrich, K. and (1986). "NMR of proteins and nucleic acids." Wiley and Sons, Nueva York. .
- Yadavalli, V. K., J. G. Forbes, et al. (2006). "Functionalized self-assembled monolayers on ultraflat gold as platforms for single molecule force spectroscopy and imaging." *Langmuir* 22: 6969-6976.
- Zhao, M., D. Cascio, et al. (2011). "Structures of segments of alpha-synuclein fused to maltose-binding protein suggest intermediate states during amyloid formation." *Protein Sci* 20(6): 996-1004.

8. Anexos

8. Anexos

8.1. Material suplementario

8.1.1 Introducción a las técnicas empleadas

8.1.1.1 Modo de imagen por AFM

El AFM en su modo de imagen ha contribuido al desarrollo de la biología estructural. Mediante el movimiento controlado de su piezoeléctrico, la punta del sensor mecánico recorre línea a línea un área de la superficie de la muestra detectando su distribución de masa y reconstruyendo su topografía con resolución tridimensional subnanométrica. Además registra las fuerzas de interacción punta-superficie tanto en vacío, como en ambiente gaseoso o líquido, pudiendo caracterizar la topología de células y moléculas de proteína aisladas en condiciones fisiológicas.

La posibilidad de operar en medio líquido es una característica muy apropiada para su aplicación al estudio de muestras biológicas, en condiciones fisiológicas. Además nos posibilita observar en tiempo real procesos biológicos que estén ocurriendo en este medio (Muller *et al.* 2002). Asimismo, permite inducir y determinar *in situ* distintas conformaciones del espécimen, caracterizar sus interacciones con otros especímenes (topológica- y dinámicamente) y manipularlo al nivel de molécula individual para caracterizar sus propiedades mecánicas (de Pablo *et al.* 2003; Valbuena *et al.* 2007). Hay que resaltar que estas imágenes se realizan sobre especímenes biológicos nativos (libres de agentes de contraste, a diferencia de la EM) gracias a la elevada relación señal/ruido de la técnica. Recientemente han proliferado montajes experimentales e incluso comerciales que combinan el AFM con la microscopía óptica y de fluorescencia, permitiendo observar un mismo proceso a escalas nano- y micrométrica (Sarkar *et al.* 2004). Si bien los procesos a caracterizar por AFM deben implicar cambios estructurales superiores al límite de resolución de este microscopio (aproximadamente 1 nm).

En resumen, la AFM es una técnica estructural de alta resolución complementaria a las clásicas (cristalografía de rayos X, NMR y EM) con bastantes ventajas, aunque también varios inconvenientes que se resumirán a continuación.

8.1.1.1.1. Principio físico

El barrido de la superficie se realiza moviendo la muestra sobre la sonda estacionaria con una trayectoria en *zigzag* de forma que se registra una línea $y_i(x, z)$ y a continuación la siguiente $y_{i+1}(x, z)$. Este movimiento se realiza gracias a un posicionador piezoeléctrico (**Fig. 1-13**) que posee la capacidad de extenderse y contraerse con enorme precisión como respuesta a un voltaje aplicado (concretamente, a su intensidad y polaridad). Está compuesto por tres electrodos piezoeléctricos distintos que operan de forma independiente en cada dirección espacial x , y y z . Aplicando un voltaje de corriente alterna distinto para cada uno de los tres ejes (y previa calibración con muestras patrón) se logra el movimiento requerido para el barrido en x e y (direcciones de barrido rápida y lenta, respectivamente) y el movimiento vertical (en z), que corrige la altura en respuesta a la señal láser registrada en un fotodiodo (**Fig. 1-13**). El mapa

topográfico se obtiene en la mayoría de las medidas manteniendo la fuerza entre la punta y la muestra constante durante el barrido, esto es, manteniendo la deflexión de la punta constante. Para ello un circuito de retroalimentación (o *feedback*) recibe los cambios registrados en el fotodiodo y calcula el voltaje que se aplicará al piezoeléctrico en z para que se contraiga o expanda convenientemente.

El haz láser es producido por un diodo y enfocado mediante un sistema de lentes. Debe ser alineado manualmente (mediante un sistema de tornillos micrométricos) para que incida sobre el extremo de la micropalanca sensora (que lo refleja) y centrado, también manualmente, en el fotodiodo detector; de forma que en estado de no contacto el cero de fuerzas laterales y verticales corresponda con el (0, 0) del fotodiodo (ver **Sección 8.1.2**).

Para determinar la fuerza entre punta y muestra, el fotodiodo realiza la comparación entre intensidades de luz incidentes en cada par de sectores que lo dividen y proporciona las correspondientes diferencias de voltaje (convertible a valores de fuerza una vez conocida la constante elástica de la micropalanca).

La electrónica de control, compuesta por una unidad de alto voltaje y una tarjeta con un procesador digital de señal (DSP) opera con la señal de error resultante de la comparación entre la señal medida y un valor establecido, y la usa como señal de alimentación del feedback que hará reaccionar a su vez al piezoeléctrico. El microscopio se posa sobre una mesa anti-vibratoria para amortiguar todo ruido mecánico externo de baja frecuencia que pudiera ser transmitido a la micropalanca.

La punta del sensor (**Fig. 8-1**) puede tener geometría piramidal o cónica y suele ser de nitruro de silicio (Si_3N_4). El radio del extremo de la punta y su longitud efectiva de penetración afectan a la resolución espacial de la imagen, de manera que si la punta es más gruesa que el espécimen se da el efecto de convolución (**Fig. 8-1b**). En este caso la imagen obtenida no es real sino que está sobredimensionada en las dimensiones x - y (laterales), mientras que sí es real en el eje z . Por eso la punta deberá ser siempre menor que el objeto que se pretenda resolver. Como consecuencia, una de las líneas de investigación en desarrollos técnicos más activas del campo en instrumentación es la fabricación de puntas cada vez más afiladas. Existen ya en el mercado puntas acabadas en nanotubos, soldados o crecidos a partir de ellas (**Fig. 8-1a**). Para materiales biológicos blandos la resolución lateral es normalmente de 1 nm. Esta resolución viene limitada no sólo por el radio de la punta sino también por la sujeción de la muestra al sustrato (Muller *et al.* 1999).

La base del funcionamiento del AFM es la fuerza de interacción entre la punta y la muestra, la cual está descrita por la ecuación:

$$\text{Ec. 8-1} \qquad F = -\delta V / \delta r,$$

donde V es el potencial de la interacción, y r la distancia entre punta y muestra. Esta interacción presenta una región repulsiva ($F > 0$) que corresponde a una situación de contacto entre punta y muestra, y una región atractiva ($F < 0$) que corresponde a la ausencia de contacto (**Fig. 8-2a**). La interacción entre punta y muestra se puede reducir a la interacción entre los átomos en los extremos de la punta y de la muestra y es asimilable a un potencial de Lennard-Jones, que describe la interacción entre dos átomos o moléculas neutras situados a una distancia r (**Fig. 8-2b**).

La ecuación resaltada en la **Figura 8-2b** corresponde al potencial de Lennard-Jones, donde ϵ es la profundidad del pozo de potencial, σ la separación entre partículas para la que el potencial se hace cero, y $2^{1/6}\sigma$ la distancia del mínimo de energía. En este potencial se diferencian dos regímenes: uno repulsivo, descrito por el término $(r)^{-6}$; y el otro atractivo, descrito por el término $(r)^{-12}$. Las interacciones que dominan cada término son de distinta naturaleza: repulsivas de corto alcance (repulsión Coulombiana), atractivas de alcance intermedio (fuerzas de van der Waals) y de largo alcance (fuerzas magnéticas y electrostáticas, y de adhesión química y capilar).

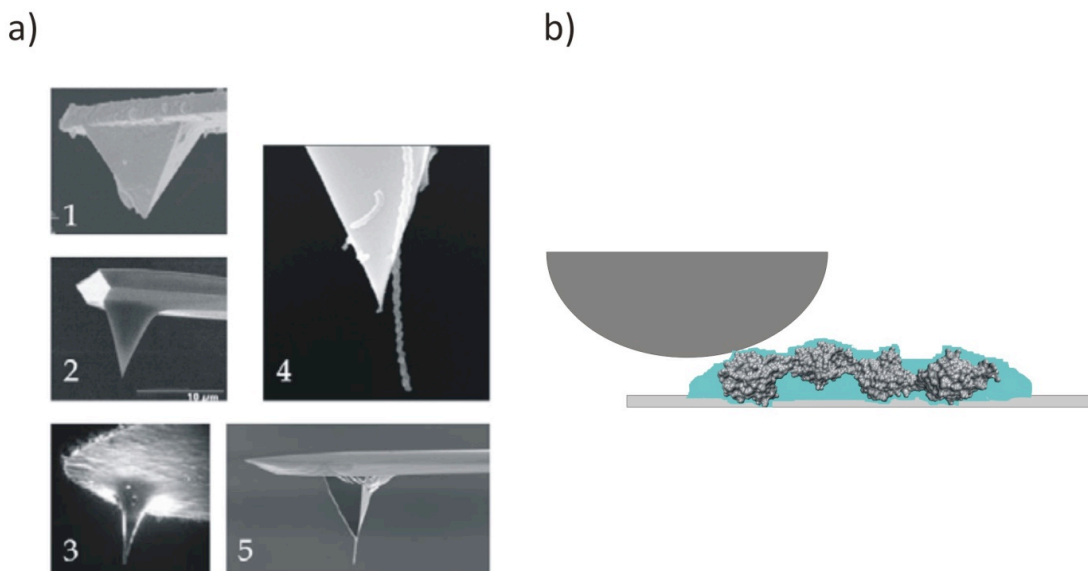


Figura 8-1. La punta del sensor del AFM. **a)** Poder resolutorio de la punta. La sensibilidad de la punta depende del radio de curvatura de su extremo y de su capacidad de penetración (definida por los ángulos de las paredes del extremo). Se están desarrollando puntas cada vez más afiladas (**1-3**) que incluso incorporan en su extremo sondas aún más finas como “nanomuelles” de 20 nm de diámetro y 1 μ m de longitud (**4**), o nanotubos de carbono de 1-2 nm de diámetro (**5**) soldados o crecidos directamente sobre ellas. **b)** Efecto de convolución de una imagen. La estructura de proteína corresponde a una tetra-ubiquitina (código PDB: 3hm3) y en azul se indica la topografía que resolvería una punta excesivamente gruesa para esta aplicación.

Las fuerzas de van der Waals (que comprenden las fuerzas de orientación, inducción y dispersión) son las que determinan a nivel atómico o molecular el funcionamiento del AFM. Las que actúan entre la punta y la muestra se pueden calcular considerando tan sólo la contribución de las fuerzas de dispersión de London (de corto alcance), asumiendo que son aditivas. Suponiendo la punta como una esfera de radio R separada una distancia z de una superficie plana (la de la muestra), la fuerza de van der Waals viene dada por la Ec. 8-2, donde H es la constante de Hamaker del material (en Julios).

$$\text{Ec. 8-2} \quad F_{vdW}(z) = -HR/6z^2$$

Normalmente la muestra en solución acuosa se deposita directamente sobre el sustrato y se deja adsorber por simple fisisorción (aunque también existen protocolos establecidos de anclaje covalente y derivatización de superficies). La superficie más utilizada para imagen por AFM es la mica ($KAl_2(AlSi_3O_{10})(OH)_2$), que recién exfoliada se convierte en un sustrato cristalino atómicamente plano y cargado negativamente. El proceso de fisisorción está gobernado por las fuerzas de van der Waals, por el efecto hidrofóbico y por la fuerza electrostática de doble capa

(fuerza EDL). Esta fuerza EDL depende enormemente de la naturaleza y distribución de cargas en el sustrato y la muestra. Además, esta fuerza gobierna la fuerza DLVO (de Derjaguin, Landau, Verwy y Overbeek; (Israelachvili 1998)) que determina la fuerza de interacción entre punta y muestra:

$$\text{Ec. 8-3} \quad F_{DLVO} = (4\sigma_s\sigma_t R\lambda_D/\epsilon\epsilon_0)e^{-r/\lambda_D} - HR/6r^2$$

El primer término de la ecuación es la fuerza EDL, cuyo alcance (λ_D) depende de la naturaleza de los iones del medio (carga y radio iónico), mientras que el segundo término son las fuerzas de van der Waals (Ec. 8-2). La fuerza efectiva de la punta sobre la muestra resulta de la suma de $F_{aplicada} + F_{DLVO}$, y puede minimizarse logrando unas condiciones experimentales óptimas para cada medida concreta. Por todo ello, una gran parte del éxito en imagen por AFM es la elección de un tampón adecuado para operar con una fuerza mínima que no distorsione la muestra y que permita una buena sujeción del espécimen al sustrato.

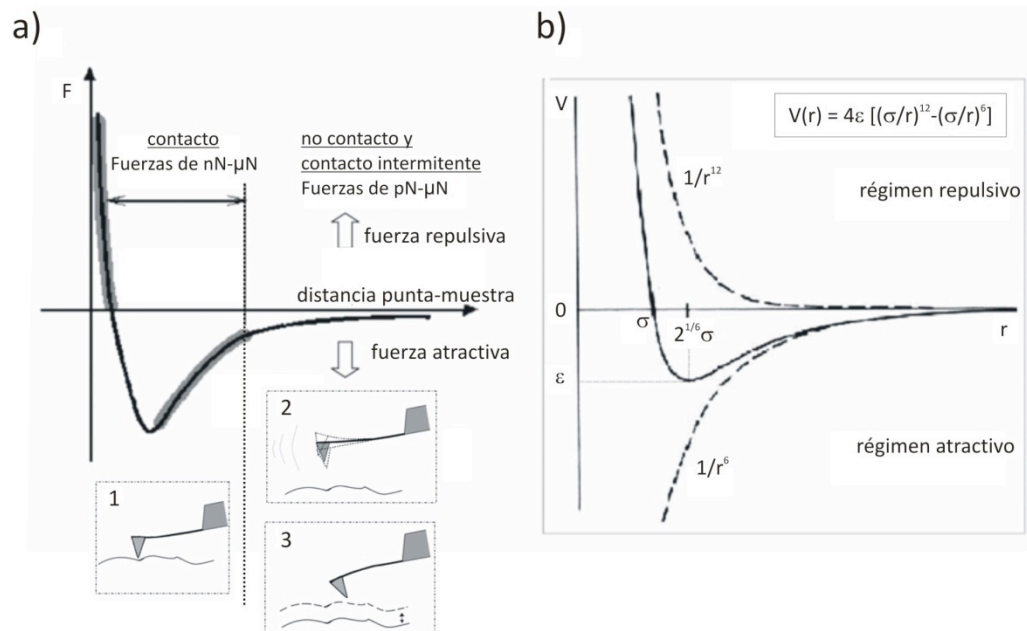


Figura 8-2. Fundamento físico del funcionamiento del AFM. a) Fuerza de interacción entre los átomos de la punta y la superficie (o muestra) vs. distancia. Los recuadros marcan los tipos de adquisición de imagen y el régimen en el que actúan (ver **Sección 8.1.1.1.2**; (1) modo de contacto, (2) modo de no contacto, “dinámico” o de *tapping*, (3) modo de contacto intermitente o de *jumping*). **b)** Potencial de Lennard-Jones con el que se modelizan las fuerzas representadas en **a**.

Existen algunos factores que afectan críticamente la capacidad de tomar imágenes por AFM, así como su resolución. El efecto de deriva (*drift*) del piezoeléctrico se debe a que, bien en la dirección x o en la y, se producen saltos en el barrido, de forma que los orígenes de dos líneas consecutivas de la imagen están desplazados uno respecto del otro, resultando en una deformación de las formas de la topografía, que resultan alargadas o estrechadas. Se debe en ocasiones a una inestabilidad térmica, en otras es debido a un cambio en las coordenadas del centro del área barrida. Dicho cambio de coordenadas lo debe realizar el propio piezoeléctrico, reaccionando a un voltaje externo, y aunque lleva a cabo inicialmente la mayor parte del desplazamiento, el ajuste fino se produce después y el piezoeléctrico continúa barriendo

normalmente. Se habla de “efecto punta” cuando ésta tiene una geometría distinta a la ideal (puntual) bien por factores intrínsecos (desgaste o mala fabricación), o bien por factores extrínsecos (por tener adherido algún material contaminante). El resultado son imágenes donde todas las rugosidades de la superficie muestran idéntica forma (la de la punta que las perfila) en lugar de su morfología propia. Si este efecto se debe a una contaminación de la punta con la propia muestra (generalmente reversible), se hace oscilar la punta en una región de no contacto para liberarla de estas contaminaciones, para después volver a tomar imágenes. De forma similar se habla de “punta doble o múltiple” cuando la punta presenta más de una terminación con las que tocar la superficie, generando perfiles repetidos de cada relieve de la superficie.

8.1.1.1.2 Modalidades de adquisición de imagen

A continuación se describen brevemente las modalidades de adquisición de imagen por AFM que son posibles en medio líquido.

El modo de contacto opera, como su propio nombre indica, en el régimen de contacto, donde predominan las fuerzas repulsivas de corto alcance. La distancia punta-muestra se mantiene a pocos Å, y durante el barrido se mantiene constante la deflexión de la micropalanca y se mide la fuerza lateral a partir del registro de la torsión de ésta, lo que resulta en diferentes alturas en la superficie de la muestra depositada.

El modo dinámico (*tapping mode*) opera en el régimen de no-contacto, a una distancia punta-muestra que oscila entre las decenas y las centenas de Å, donde predominan las fuerzas atractivas de largo alcance. Un segundo piezoeléctrico hace resonar la micropalanca, sea con amplitud constante (A_0), sea con frecuencia constante (ν_0), de forma que las variaciones en frecuencia o en amplitud (respectivamente) se hacen corresponder con cambios topográficos (Moreno-Herrero *et al.* 2002).

El modo de contacto intermitente o de salto (*jumping mode*, **Fig. 8-3**) funciona de la siguiente manera: en cada punto de la imagen se registra un espectro de fuerza reajustando cada vez la distancia punta-muestra para que la fuerza normal ejercida no supere la ajustada por el usuario (el *setpoint*, normalmente de 20-100 pN) y registrando la altura z a esa fuerza y la adhesión y la pendiente de la curva para generar los mapas de topografía, de adhesión y de rigidez, respectivamente. El desplazamiento al punto consecutivo tiene lugar fuera del contacto (el tamaño del salto elegido es siempre unos pocos nanómetros mayor que la altura del espécimen analizado) con lo que se minimiza el tiempo de interacción entre la punta y la muestra y la potencial alteración de ésta, y el posible efecto de desplazamiento del espécimen por el sustrato al ser arrastrado por la punta. Se trata de un modo más lento que los otros por la cantidad de puntos intermedios tomados para cada curva (*jump sample*), proporcionales al tamaño del salto (*jump off*), y por el tiempo de espera entre cada ciclo (*control cycles*). Sin embargo, por otro lado, ofrece un control más fino de la fuerza y es por tanto menos agresivo con muestras blandas como las biológicas típicas (Moreno-Herrero *et al.* 2004).

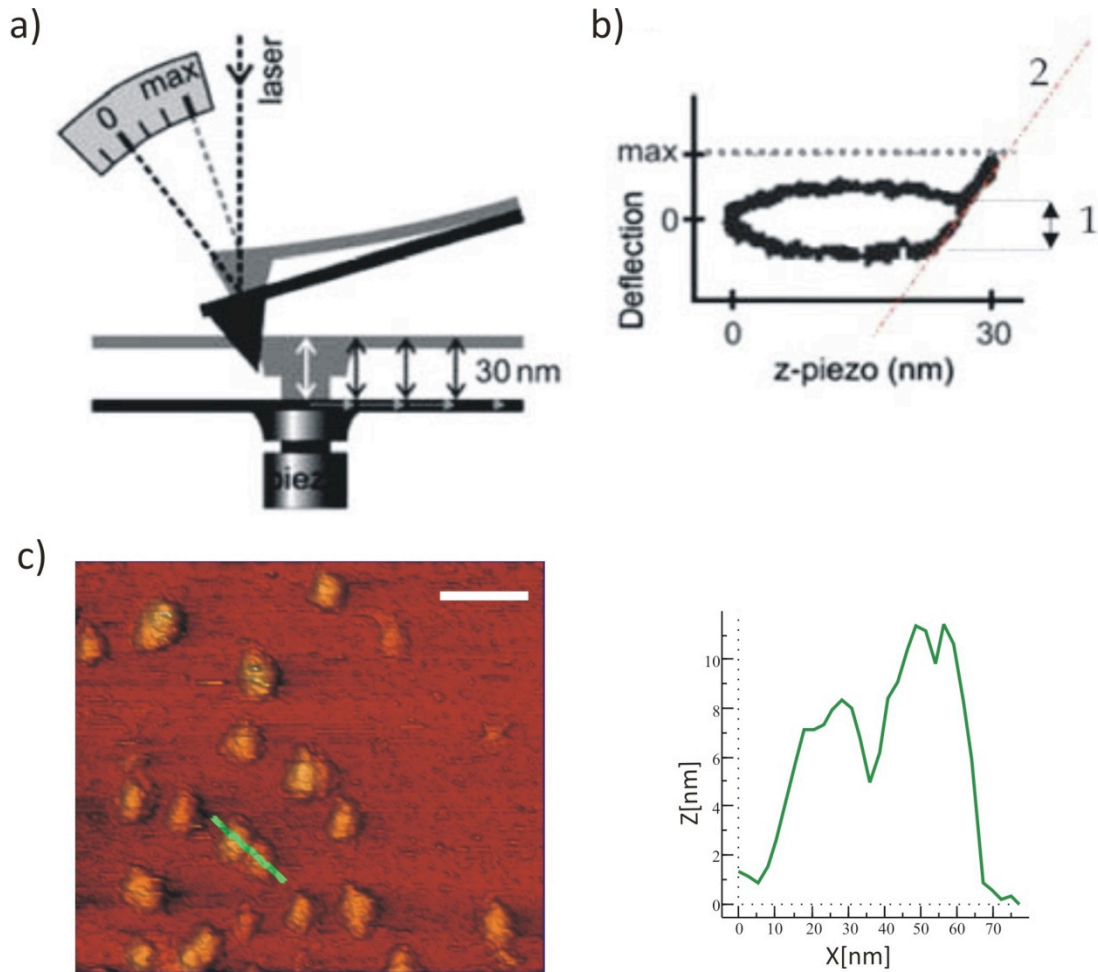


Figura 8-3. Modo de salto “jumping mode” en líquido. a) Esquema del estado de la micropalanca en los dos extremos del salto en el modo jumping. En negro se representa la posición en la que el piezoeléctrico está retraído, y por tanto no hay contacto punta-muestra (fuerza cero). En esta posición se efectúa el desplazamiento lateral al siguiente punto de la imagen. En gris se representa la posición del conjunto en el extremo del salto, cuando se ha alcanzado la fuerza establecida como *setpoint* (o máx en la imagen). A continuación el piezoeléctrico se retira la distancia fijada para el salto (en este caso de 30 nm) y se desplaza hacia el siguiente punto. Este ciclo da lugar a la curva fuerza-extensión que el microscopio registra en cada punto de la imagen con una fuerza máxima establecida como parámetro por el usuario. La imagen topográfica se construye a partir de la distancia vertical a la muestra a la que se alcanza el valor de la fuerza predeterminado. **b)** Representación de la curva tal y como aparece en el osciloscopio. Puesto que la medida es en líquidos, las fuerzas capilares de adhesión punta-muestra se anulan. Simultáneamente al registro del mapa topográfico se registran la adhesión del espectro fuerza-extensión (1) y la pendiente de la misma (2) para generar los correspondientes mapas de adhesión y de rigidez o *stiffness*. Figura extraída de Schaap *et al.* 2004. **c)** Imagen obtenida en *jumping* de agregados de α -syn humana. La escala de colores en la topografía marca la altura, que oscila de más oscuro (menor altura) a más claro (mayor altura). La barra verde marca un perfil para resolver el tamaño de las partículas, mostrado a la derecha. Las partículas tienen una altura de 9-12 nm, y una anchura, aunque aumentada por el efecto de convolución (nuestra punta tenía un radio de ~30 nm, *cantilever* de Biolever, *Olympus*), demasiado grande para corresponderse con moléculas individuales en estado monomérico. La barra de escala corresponde con una longitud de 80 nm.

8.1.1.2. SMFS: parámetros relevantes

A continuación se describen brevemente los parámetros más relevantes que se pueden obtener de los experimentos de SMFS y su modo de obtención.

En la modalidad de length-clamp, los parámetros típicos que maneja la SMFS son la fuerza de desplegamiento (F_u) y el ΔL_c . Como se ha explicado anteriormente (ver **Sección 1.3.2.1.2**), el ΔL_c se deduce del ajuste de los picos en un espectro fuerza-extensión al modelo WLC, y se corresponde con el número de aminoácidos contenido en la región desplegada multiplicado por la contribución en longitud de cada uno de ellos a la fuerza de estiramiento empleada ($p = 0.4$ nm, (Ainavarapu *et al.* 2007)). Como se trata de un proceso secuencial, si el punto de ruptura se encuentra entre los extremos de la proteína, la distancia entre dos picos consecutivos corresponderá con el tamaño de la proteína desplegada, a no ser que existan intermedios del desplegamiento.

El parámetro que determina la estabilidad mecánica de un módulo es su F_u . Como la fuerza es una magnitud vectorial, la estabilidad mecánica de una proteína dependerá no sólo de la magnitud de la fuerza aplicada, sino también de su punto de aplicación, dirección y sentido (Carrión-Vázquez *et al.* 2003). Los valores de estabilidad mecánica de cada repetición de una poliproteína no son iguales debido al carácter estocástico del proceso. Esto se explica considerando que el desplegamiento mecánico de una proteína mediante SMFS es el resultado de dos tipos de fuerzas que actúan sobre ella simultáneamente: las térmicas y las mecánicas. Por eso la F_u de una proteína individual se expresa como el promedio de valores de un histograma de frecuencias cuyo valor medio representa su estabilidad mecánica.

En términos cinéticos, los experimentos de SMFS permiten la caracterización de las barreras (energías de activación en la teoría de Arrhenius) que una proteína ofrece a su estiramiento en términos de altura (ΔG_d^\ddagger) y localización en la dirección N-C terminales (Δx_d). Empleando de base la teoría del estado de transición convencional, podemos estimar los parámetros cinéticos del proceso de desplegamiento (y replegamiento) (Bell 1978; Evans y Ritchie 1997). La aplicación de una fuerza mecánica inclina el diagrama de energía del proceso de desplegamiento espontáneo, disminuyendo la barrera al estado de transición y aumentando la tasa de reacción (**Fig. 1-15a**). Podemos calcular la densidad de probabilidad para el desplegamiento, que predice la fuerza de desplegamiento más probable (estabilidad mecánica) usando la Ec. 8-4) (Bell 1978; Evans y Ritchie 1997; Bustamante *et al.* 2004):

$$\text{Ec. 8-4} \quad F_u = (k_B T / \Delta x_d) \ln (r \Delta x_d / k_d^0 k_B T)$$

Utilizando esta expresión analítica, podemos calcular los parámetros cinéticos del proceso de desplegamiento: k_d^0 (tasa de desplegamiento espontáneo o a fuerza cero) y Δx_d (anchura de la barrera de energía de activación: distancia en las coordenadas de reacción sobre la que debe aplicarse la fuerza para alcanzar el estado de transición). Esta ecuación predice que la estabilidad mecánica de una proteína (F_u) depende de la distancia al estado de transición (Δx_d), la altura de la barrera (ΔG_d^\ddagger , la cual depende de k_d^0), la energía térmica, y la tasa de carga de la fuerza (r) empleada durante el estiramiento de la proteína (Ec. 8-5, donde v es la velocidad de estiramiento y k la constante elástica, **Fig. 1-15b**).

$$\text{Ec. 8-5} \quad r = dF/dt = kv$$

Las constantes de desplegamiento (k_d) y de plegamiento (k_p) en función de la fuerza aplicada se obtienen de las siguientes expresiones:

$$\text{Ec. 8-6} \quad k_d(F) = A e^{-(\Delta G_d^\ddagger - F\Delta x_d)/k_B T}$$

$$\text{Ec. 8-7} \quad k_p(F) = A e^{-(\Delta G_p^\ddagger + F\Delta x_p)/k_B T},$$

donde A es el factor de frecuencia o prefactor. En resumen, la aplicación de una fuerza F aumenta la constante de desplegamiento reduciendo la energía de activación por $F\Delta x_d$, pero disminuye su tasa de plegamiento.

Existen varios modos de caracterizar la dependencia de la F con la tasa r , dependiendo del modo en el que se realicen los experimentos de SMFS. En el modo de *length-clamp* (ver **Sección 1.3.2.1.2**), como el experimento se realiza a una velocidad fijada, se toman medidas a diferentes velocidades para calcular la dependencia de la F con la velocidad de estiramiento. Una vez obtenida esta dependencia, se realizan simulaciones de Monte Carlo del desplegamiento de la poliproteína a diferentes velocidades (Carrión-Vázquez *et al.* 1999). Mediante estas simulaciones modelizamos la extensión de la proteína mediante su elasticidad entrópica (como la que se describe en los experimentos mediante el WLC), y el desplegamiento de sus módulos individuales siguiendo un modelo de dos estados. Según este modelo, la probabilidad de que ocurra el desplegamiento de cualquier módulo en cada paso es:

$$\text{Ec. 8-8} \quad P = Nk_d\Delta t,$$

donde N es el número de módulos plegados, k_d es la constante de desplegamiento (Ec. 8-6), y Δt es el intervalo de muestreo. La simulación se realiza a diferentes velocidades utilizando diferentes combinaciones de k_d^0 (tasa de desplegamiento a fuerza cero) y Δx_d hasta que se consigue imitar la dependencia de F con la velocidad de estiramiento experimental (Carrión-Vázquez *et al.* 1999).

Si, por otra parte, realizamos experimentos en el modo de *force-ramp* (ver **Sección 1.3.2.1.2**), esta dependencia se obtiene directamente puesto que aumentamos a velocidad constante la fuerza a la que sometemos a la proteína. Una vez representado en un histograma las frecuencias de fuerzas de desplegamiento, se integra ese histograma para obtener la probabilidad de desplegamiento a una fuerza determinada. Como en este caso se conoce r puesto que está impuesta por nosotros, podemos calcular esa probabilidad de desplegamiento mediante la ecuación:

$$\text{Ec. 8-9} \quad P_d(F) = 1 - \exp \{k_d^0 k_B T / r \Delta x [1 - \exp (F \Delta x / k_B T)]\}$$

Así, podemos obtener k_d^0 y Δx para representar el paisaje energético del desplegamiento y comparar la estabilidad mecánica de diferentes proteínas (Valbuena *et al.* 2009).

8.1.1.3 SMFS : logros y limitaciones

Logros

El empleo de poliproteínas como marcadores monomoleculares en SMFS ha permitido la caracterización del proceso de desplegamiento y repliegamiento de proteínas con gran detalle. Se ha visto que las diferentes estructuras de las proteínas tienen comportamientos determinados, hasta el punto de que puede predecirse con alto grado de fiabilidad el comportamiento mecánico de una proteína en base a su estructura (Valbuena *et al.* 2009). A continuación detallamos algunos descubrimientos en el campo que han permitido conocer más acerca del proceso de plegamiento/desplegamiento de las proteínas. También se mencionan algunos trabajos que relacionan la mecánica con procesos enzimáticos y celulares, lo que destaca la importancia de la nanomecánica de proteínas para entender una gran variedad de procesos fisiológicos.

Los primeros trabajos en el campo asentaron las bases de la nanomecánica de proteínas gracias a las ventajas de las poliproteínas. Inicialmente, se descubrió que las proteínas ricas en estructura β son mecánicamente más estables que las ricas en estructura α (Carrión-Vázquez *et al.* 2006). Igualmente se descubrió que, con frecuencia, los determinantes de la estabilidad mecánica de una proteína son parches de enlaces de hidrógeno entre elementos de estructura secundaria, si bien en algunos casos se ha visto que el núcleo hidrofóbico también contribuye a la estabilidad mecánica (Ng *et al.* 2005; Carrión-Vázquez *et al.* 2006). Asimismo, se comprobó el carácter vectorial de la fuerza en el desplegamiento de proteínas, ya que la estabilidad mecánica de una proteína depende de la geometría del estiramiento (Carrión-Vázquez *et al.* 2006) y del punto de aplicación de la fuerza (Carrión-Vázquez *et al.* 2003). Por otra parte se ha visto que la estructura terciaria de algunas proteínas puede aportar características nanomecánicas determinadas, como el comportamiento Hookeano de la superhélice formada por la estructura solenoide de la ankirina B (Lee *et al.* 2006). Recientemente nuestro grupo caracterizó la proteína nativa con la mayor estabilidad mecánica descrita hasta la fecha, una proteína con unos largos parches de enlaces de hidrógeno que abrochan los extremos de la proteína (Valbuena *et al.* 2009). También en nuestro grupo se ha demostrado la regulación de la nanomecánica de proteínas por unión a iones, en concreto de la C-cadherina por coordinación de Ca^{2+} (Oroz *et al.* 2011). Finalmente, respecto a la relación de la nanomecánica de proteínas con la patología, hay que destacar un trabajo reciente en el que se ha descubierto que ciertas mutaciones puntuales implicadas en poliquistosis humanas afectan a la nanomecánica de la proteína poliquistina, un hipotético sensor mecánico de los cilios del riñón (Ma *et al.* 2009).

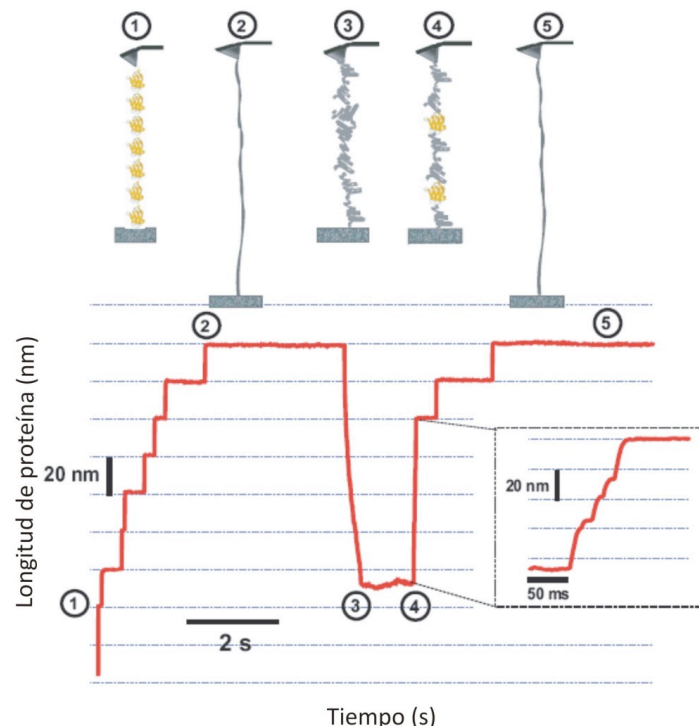


Figura 8-4. Replegamiento de una molécula de poliproteína de ubiquitina monitorizada en tiempo real mediante *force-clamp*. En este tipo de experimentos, primero se despliega la proteína completa manteniendo un desplazamiento del piezoeléctrico límite para impedir que la molécula se suelte, y posteriormente se reduce esta distancia durante un tiempo determinado para facilitar que la proteína se repliegue. Finalmente, se vuelve a repetir el ciclo. Estos estudios permiten analizar el proceso de plegamiento con gran resolución temporal. Imagen tomada de García-Manyes *et al.* 2007.

Mediante SMFS se ha abordado también el proceso de plegamiento de proteínas bajo fuerza (**Fig. 8-4**). Por ejemplo, se siguió el proceso de plegamiento de una proteína sometida a bajas fuerzas, tanto a nivel de poliproteína como de monómero (Fernandez y Li 2004; Garcia-Manyes *et al.* 2007; Garcia-Manyes *et al.* 2009). En otros trabajos recientes, mediante la construcción de un AFM con la resolución de fuerza aumentada por disminución del *drift* del piezoeléctrico (ver **Sección 8.1.1.1**) se ha caracterizado el equilibrio entre la forma apo- y holo- de la proteína calmodulina (Junker *et al.* 2009), así como la observación directa del equilibrio de plegamiento mecánico de un módulo individual (Schlierf *et al.* 2007). Por otra parte, mediante métodos de generación de poliproteínas enlazadas en diferentes posiciones (distintas de las enlazadas por los terminales N- y C-) por mutagénesis de inserción dirigida de residuos de cisteína y subsiguiente formación de enlaces disulfuro, se desarrolló una estrategia para la determinación estructural mediante SMFS (Dietz y Rief 2006). También se ha utilizado la SMFS para monitorizar reordenamientos en el sitio activo de una enzima con una resolución sin precedentes (Wiita *et al.* 2007; Wen *et al.* 2008).

A pesar de que las tasas de carga de la fuerza *in vivo* se estima que sean más bajas que las empleados *in vitro*, y por tanto también lo sean las fuerzas de desplegamiento, los resultados de SMFS pueden llegar a explicar los mecanismos moleculares que subyacen a diversos procesos fisiológicos. Por ejemplo, a través de datos de nanomecánica de los diferentes componentes de las regiones de la titina cardíaca se consiguieron explicar las bases moleculares de la elasticidad pasiva del músculo (Li *et al.* 2002). Igualmente, mediante la

comparación de la estabilidad mecánica de diferentes mutantes de I27 y su tasa de internalización por traslocasas mitocondriales, se indujo un modelo de funcionamiento de estas maquinarias (Sato *et al.* 2005). Finalmente, utilizando pinzas ópticas se ha conseguido medir la procesividad del ribosoma con resolución de un único codón (Wen *et al.* 2008).

Limitaciones

El éxito en un experimento de SMFS se basa fundamentalmente en los siguientes factores: calidad de la muestra, capacidad del espécimen de adsorberse al sustrato sin desnaturalizarse, empleo de una concentración de muestra no demasiado elevada para disminuir el ruido en los datos, y que la proteína a analizar tenga una estabilidad mecánica que se pueda medir por la técnica. Todos ellos pueden optimizarse de un modo empírico empleando diferentes sustratos o métodos de funcionalización, o también mediante estrategias de biología molecular para posibilitar una identificación inequívoca de eventos de desplegamiento de proteínas con baja estabilidad mecánica. Todos estos factores pueden comprometer el éxito de estos experimentos, a pesar de que la SMFS es una técnica de toma de datos rápida y, si el AFM se encuentra en condiciones estables, las sesiones pueden durar días enteros con un requerimiento mínimo por parte del usuario si se ha automatizado el ajuste de la línea base de los espectros.

Como la técnica se basa en el escaneo mediante la punta del AFM de una cantidad determinada de puntos localizados en una superficie, resulta evidente pensar que si se consigue concentrar los anclajes de las proteínas en zonas intencionadamente localizadas del sustrato el éxito de la técnica aumentaría (Yadavalli *et al.* 2006). También sería óptimo poder visualizar la muestra mediante imagen antes de proceder a su estiramiento. En nuestro grupo hemos desarrollado un sistema de hardware y software para poder comunicar los dos programas de adquisición de datos necesarios (WSxM de *Nanotec Electrónica*, para toma de imágenes; e Igor Pro de *Wavemetrics*, para SMFS), lo que nos permite realizar una imagen de la superficie hasta encontrar proteínas individuales y proceder a su estiramiento (**Fig. 8-5a,b**; (Valbuena *et al.* 2007)). Sin embargo, en la práctica es difícil compatibilizar las dos técnicas debido a que las condiciones experimentales de ambas son diferentes (normalmente se emplea mica como sustrato y una concentración baja de proteína para imagen, mientras que para SMFS se suele utilizar una concentración mayor y otro tipo de sustratos que resultan inaceptablemente rugosos para imagen) y a la facilidad con la que la punta puede resultar contaminada tras repetidos ciclos de estiramientos, lo que disminuye notablemente la resolución de las imágenes.

Otro campo de experimentación de SMFS son los análisis de fuerzas de ruptura de interacciones intermoleculares en proteínas. La estrategia más común es funcionalizar la punta y la superficie con moléculas orgánicas de longitud conocida con grupos reactivos en los extremos para que la muestra pueda unirse covalentemente a ellas (**Fig. 8-5c**). De esta forma se dispone de un espaciador que nos sirve para distinguir los eventos de ruptura de la interacción bajo examen de las interacciones inespecíficas. No obstante, como aquí no se dispone de patrones de señal repetitivos sobre los que basar nuestra identificación (como las poliproteínas en interacciones intramoleculares), habitualmente se emplean otros métodos bioquímicos complementarios como controles externos. Lo más habitual es añadir agentes bloqueantes o

antagonistas a la solución experimental en cuya presencia el pico de fuerza atribuido a la ruptura de la interacción desaparece (**Fig. 8-5d**). En esta tesis no se han realizado este tipo de experimentos, por lo que para este tema debemos remitir a revisiones específicas donde se describen la metodología y hallazgos más relevantes (Hinterdorfer 2002; Weisel *et al.* 2003; Carrión-Vázquez *et al.* 2006).

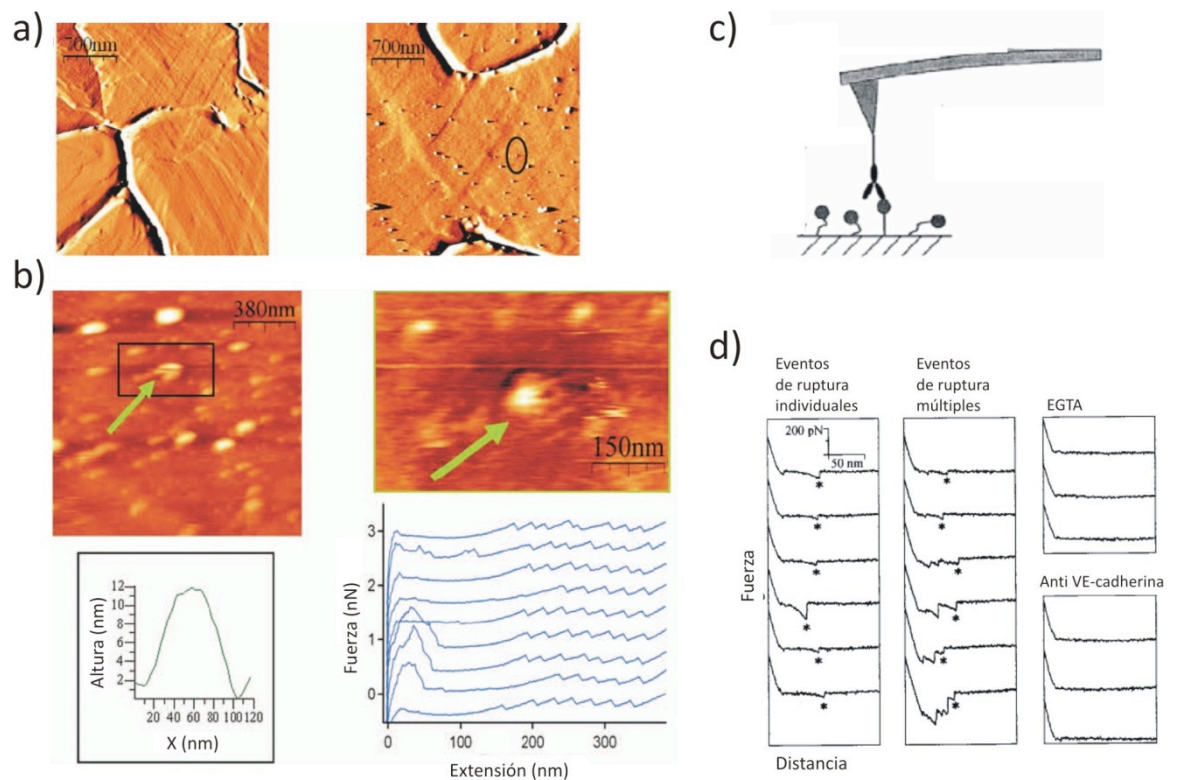


Figura 8-5. Adquisición de imágenes quasi-simultáneas a SMFS y estrategia de experimentos de SMFS intermolecular. **a)** Imagen derivada ecualizada de la topografía de un sustrato de oro flameado tomada en tapping antes (izquierda) y después (derecha) de añadirle la muestra de proteína. El círculo negro marca una molécula individual de poliproteína $(127)_8$. **b)** Imagen y SMFS simultáneo. Una vez reconocida una proteína individual (abajo a la izquierda se muestra un perfil que puede ajustarse al tamaño de un $(127)_8$ individual) procedemos a su estiramiento repetidas veces a la vez que vamos barriendo sobre ella para adquirir imágenes. La resolución de la imagen se reduce en este caso por posibles contaminaciones de la punta al quedársele adsorbido material de la muestra. **c)** Esquema de la metodología típica de un experimento de SMFS de interacciones intermoleculares. **d)** Típicos espectros fuerza-extensión obtenidos en SMFS de interacciones. En este caso se trata de la ruptura de interacciones entre E-cadherinas. Figura tomada de Baumgartner *et al.* 2000.

Existen casos en los que se da una evidente falta de correlación entre los resultados de SMFS y los resultados derivados de técnicas bioquímicas y celulares. Para solventar estas discrepancias, en el futuro deberá enfatizarse la importancia de las condiciones experimentales para que los experimentos de SMFS mimeticen fielmente la situación fisiológica en la que se encuentra la proteína. Esto incluye: realizar los experimentos de SMFS en un ambiente natural para la proteína (Janovjak *et al.* 2003; Kessler y Gaub 2006), optimizar las condiciones ambientales (Leake *et al.* 2006), investigar proteínas multimodulares o poliproteínas en paralelo para obtener agregados homotípicos, los cuales son frecuentes *in vivo* (Liversage *et al.* 2001; Sarkar *et al.* 2004) o estudiar alteraciones en las propiedades mecánicas inducidas por

interacción con un ligando (Junker *et al.* 2009). Esto último podría ser extremadamente útil en el estudio de la señalización mecánica. En este contexto, los datos de la SMFS podrían combinarse con los derivados de técnicas de fluorescencia de molécula individual (como la microscopía de fluorescencia de reflexión total interna o TIRF; o la transferencia de energía resonante fluorescente o FRET) para poder detectar eventos mecánicos y de señalización bioquímica en la misma muestra (Kellermayer *et al.* 2006; Sarkar *et al.* 2007).

8.1.1.4. Dicroísmo Circular

El espectro de CD se origina por la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente hacia la derecha y hacia la izquierda por un cromóforo asimétrico o situado en un entorno asimétrico, como son las hélices α o las estructuras β en proteínas. En consecuencia, una luz incidente y circularmente polarizada pasa a estar elípticamente polarizada. En las proteínas los grupos ópticamente activos más importantes son el enlace peptídico y las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos; éstos últimos pueden dar lugar a bandas intensas en la región de 220-230 nm (UV lejano) de λ . El enlace peptídico absorbe también en el UV lejano del espectro de CD. La posición e intensidad de las bandas es altamente sensible a la configuración del enlace peptídico dando lugar a espectros característicos para cada tipo de estructura secundaria (α hélice, hoja β , giros β , hélices de poli-L-prolina, etc., (Brahms y Brahms 1980). Las variaciones en la estructura secundaria (UV lejano) y terciaria (UV cercano) que se producen durante la desnaturalización de proteínas pueden seguirse fácilmente a partir de las variaciones en el espectro de CD (Pace *et al.* 1989).

Así, la sintonía o desacoplamiento en las variaciones de la elipticidad (magnitud mediante la cual se representa el fenómeno de CD) con la temperatura (o la presencia de agentes caotrópicos) a distintas λ puede aportar información sobre la posible formación de intermedios en procesos de desnaturalización o renaturalización de proteínas. Lo habitual es establecer un espectro característico de la proteína en condiciones nativas para determinar una λ a la que la proteína muestra una intensidad máxima de señal, que será la λ a la que se caracterizará la pérdida de estructura secundaria, como representación del proceso de desnaturalización térmica (o química). Dado que la ΔG de desplegamiento depende de la temperatura, si se asume que el cambio en capacidad calorífica asociada al desplegamiento no depende de la temperatura se pueden obtener las ecuaciones:

$$\text{Ec. 8-10} \quad \Delta H(T) = \Delta H_m + \Delta C_p \cdot (T - T_m)$$

$$\text{Ec. 8-11} \quad \Delta S(T) = \Delta H_m/T_m + \Delta C_p \cdot \ln(T/T_m),$$

donde T_m es la temperatura de desnaturalización de la proteína (temperatura a la cual $\Delta G = 0$) y ΔH_m es la entalpía de desplegamiento a dicha temperatura. La combinación de las Ec. 8-10 y 8-11 conduce a:

$$\text{Ec. 8-12} \quad \Delta G(T) = \Delta H_m \cdot (1 - T/T_m) + \Delta C_p \cdot [T - T_m - T \cdot \ln(T/T_m)],$$

que se conoce como la ecuación Gibbs-Hemholtz integrada, y que describe con buena aproximación la curva de estabilidad de las proteínas. Para el caso de proteínas cuya desnaturalización térmica es reversible y se ajusta a un modelo de dos estados, los parámetros

termodinámicos necesarios para la aplicación de la Ec. 8-10 (T_m , ΔH_m y ΔC_p) pueden obtenerse en base al análisis de experimentos de desnaturalización térmica basada en espectros de CD.

8.1.1.5. Resonancia Magnética Nuclear

Aunque tengan bases físicas totalmente distintas, por NMR pueden determinarse las posiciones de cada uno de los átomos que constituyen una molécula (Wüthrich y 1986; Roberts 1993), de igual forma que en cristalografía de rayos X. La ventaja que tiene la NMR es que caracteriza la estructura de una proteína en solución, con la posibilidad de obtener información dinámica o de estados parcialmente plegados de la proteína. Por otro lado, la desventaja que tiene la NMR con respecto a la cristalografía de rayos X es el tamaño del espécimen, aunque ha habido avances en el campo que han posibilitado aumentar ese límite superior (Grishaev *et al.* 2005; Tugarinov *et al.* 2005) de forma que recientemente se ha conseguido resolver la estructura de una proteína de 82 kDa (Grishaev *et al.* 2008).

El fenómeno de la NMR ocurre como consecuencia de que los núcleos atómicos poseen una propiedad mecanocuántica denominada espín nuclear (I) que determina su capacidad de “pivotar mecánicamente” alrededor de un eje (dicho movimiento puede ser definido por su momento angular), y es un número fijo para cada tipo de núcleo (**Fig. 8-6**, (Gómez-Moreno y Sancho 2003)). Los núcleos con espín nuclear distinto de 0 se comportan como una distribución finita de carga, por lo que tienen un momento magnético m , que es proporcional y paralelo al espín nuclear I , $\mu = \gamma I$, siendo γ la denominada constante giromagnética, que es una característica de cada tipo de núcleo. Cuando un núcleo con espín nuclear distinto de 0 se encuentra dentro de un campo magnético B_0 , se produce una interacción entre éste y el μ . Un núcleo con espín I tiene $2I + 1$ orientaciones posibles dentro del campo B_0 , que vienen dadas por el número cuántico magnético m_I que toma valores entre $-I$ y $+I$. Los núcleos con espín $\frac{1}{2}$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N) dentro de un campo B_0 generan dos energías de orientación paralela y antiparalela a B_0 . Las transiciones entre los dos niveles de energía son las causantes de la señal de NMR. El nivel de menor energía (α) está más poblado que el de mayor energía (β), pero la diferencia de energías y poblaciones entre los dos niveles es muy pequeña (**Fig. 8-6a**). Esto hace que la sensibilidad de la NMR sea pequeña y se requieran muestras relativamente concentradas de proteína para la adquisición de espectros. Dado que el cociente entre las poblaciones de los dos niveles de energía es función de la diferencia de energía (ΔE) y ésta es proporcional al campo magnético B_0 , cuanto mayor sea el campo, mayor será la sensibilidad. Las transiciones entre los niveles de energía ocurren al aplicar pulsos de radiofrecuencia, que deben ser:

$$\text{Ec. 8-13} \quad \nu = \gamma B_0 / 2\pi \text{ o } \omega = \gamma B_0 ,$$

siendo ω la frecuencia de precesión a la que rota un espín respecto al campo B_0 . Esta frecuencia, denominada frecuencia de Larmor, es característica del núcleo observado. En una muestra que contenga un gran número de núcleos, todos con la misma frecuencia de Larmor, puesto que los niveles de energía no se encuentran igualmente poblados, existirá una magnetización neta paralela al campo (M). En un sistema de ejes que gira con una velocidad angular igual a la frecuencia de Larmor, M corre a lo largo del eje z (**Fig. 8-6b**). En este sistema, la aplicación de un campo magnético continuo B_1 origina la precesión de la magnetización en el plano yz (**Fig. 8-6c**). Dependiendo de la duración del pulso de radiofrecuencia, el vector de

magnetización M girará un ángulo θ distinto en el plano yz (**Fig. 8-6d**). Un pulso de 90° es el que lleva la magnetización al eje y (**Fig. 8-6e**).

Después de un pulso de 90° la magnetización precesa en el plano xy alrededor del campo magnético B_0 situado en el eje z , generando señales de radio que decaen exponencialmente con el tiempo y dan origen a la FID (*Free Induction Decay*, **Fig. 8-6e**). La transformada de Fourier (FT) de la FID pasa del dominio de los tiempos al de frecuencias dando lugar al espectro de NMR. Cada protón de la proteína, si éste es el núcleo observado, da señales a distintas frecuencias, cuya posición se mide como desplazamientos químicos (δ).

El hecho de que cada núcleo de una molécula tenga una frecuencia de resonancia distinta se debe a que el campo magnético real experimentado por un núcleo es ligeramente diferente del campo magnético externo B_0 , puesto que éste se ve modificado por la nube electrónica que rodea al núcleo. Para que las señales de las posiciones en espectros obtenidos en distintos espectrómetros sean comparables, es preciso definir un parámetro que proporcione la misma información pero que sea independiente del campo magnético B_0 . Este parámetro es el δ que se expresa en partes por millón (ppm) y viene definido por la ecuación:

$$\text{Ec. 8-14} \quad \delta_{\text{núcleo}} = (\nu_{\text{núcleo}} - \nu_{\text{referencia}}) 10^6 / \nu_0 ,$$

siendo $\nu_{\text{núcleo}}$ la frecuencia del núcleo objeto de estudio, $\nu_{\text{referencia}}$ la frecuencia de resonancia del núcleo elegido como referencia y ν_0 la frecuencia del núcleo considerado (^1H , ^{13}C , ^{15}N) en el espectrómetro, todas ellas expresadas en Herzios (Hz). La asignación del espectro consiste relacionar cada señal con su núcleo (^1H , ^{13}C , ^{15}N) de la proteína. La dispersión de los δ en los espectros de NMR de una proteína, ya que suele ser mucho más pobre en una proteína desplegada, constituye un excelente indicador del estado nativo o desnaturalizado de las proteínas.

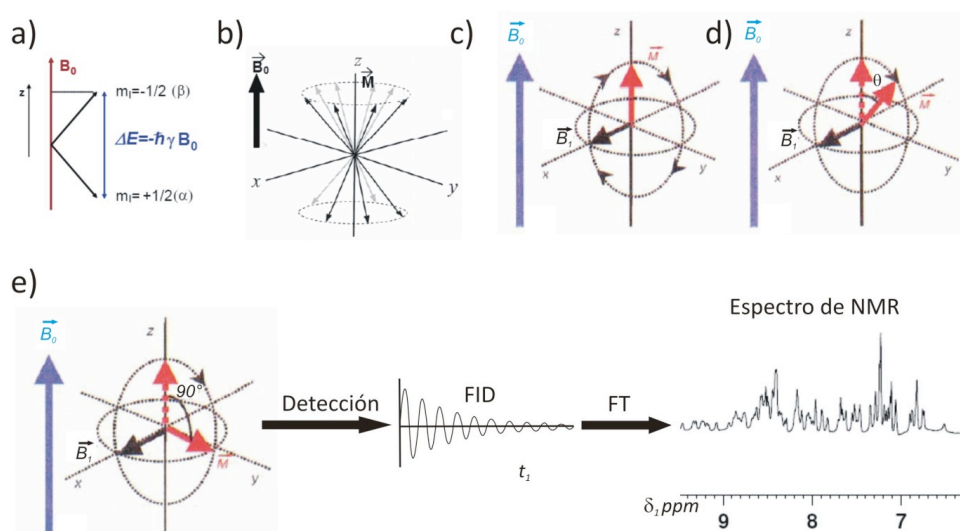


Figura 8-6. Fenómeno de NMR. **a)** Diagrama de niveles de energía de un núcleo con espín nuclear $\frac{1}{2}$ en un campo magnético B_0 . **b)** Movimiento de precesión a la frecuencia de Larmor, ω , de un sistema multiespín en un campo magnético B_0 . **c)** La aplicación continua de un pulso B_1 origina la precesión de M en el plano yz . **d)** Un pulso de radiofrecuencia B_1 con una duración t gira el vector de magnetización M un ángulo θ ($\theta = \omega t = \gamma B_1 t$). **e)** Un pulso de 90° es el que dura el tiempo requerido para llevar el vector M al

plano xy, donde se detecta la señal de NMR (FID), que da lugar al espectro mediante la transformada de Fourier. Figura tomada de Gómez-Moreno y Sancho 2003.

Por otra parte, el efecto nuclear Overhauser (NOE) se refiere a la transferencia de magnetización entre núcleos próximos en el espacio. Debido a que es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los núcleos ($1/r^6$), es una medida que es crítica para el cálculo de la estructura tridimensional de la proteína. Además se pueden detectar los enlaces de hidrógeno al disolver la muestra en D₂O, ya que los NH amídicos de la proteína se intercambiarán por deuterio. La velocidad de este intercambio es menor si los protones NH se encuentran inaccesibles al disolvente, lo que ocurre cuando forman parte de enlaces de hidrógeno. La velocidad de intercambio NH/ND se obtiene fácilmente a partir de la variación de la intensidad de la señal de NMR correspondiente al protón NH amídico en una serie de espectros registrados a distintos tiempos a partir de la disolución de la proteína en D₂O (no se observa señal de NMR para el grupo ND). Las velocidades de intercambio NH/ND lentas normalmente indican que un protón NH participa en un enlace de hidrógeno, pero no permiten identificar al aceptor (Bruix *et al.* 2008). Mediante el cálculo de acoplamiento dipolar residual (RDC) se puede definir la orientación relativa de subdominios de proteínas en los que no se observan NOEs interdominio debido a la existencia de pocos contactos entre ellos. Finalmente, las constantes de acoplamiento escalar (J) entre los espines nucleares son dependientes de distintos ángulos dihedro del esqueleto peptídico, lo que nos puede dar información cualitativa de los elementos de estructura secundaria de la proteína (Gsponer *et al.* 2006). Todos estos análisis (δ , J , RDC, NOE) finalmente confluyen en el cálculo de restricciones angulares, de orientación y distancia; que son imprescindibles para el cálculo de la estructura tridimensional de la proteína.

8.1.1.6. Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) es generalmente considerada hoy en día como la técnica más adecuada para estudiar la energética de las transiciones de plegamiento-desplegamiento de las proteínas. Esta técnica permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en proteínas (Privalov y Khechinashvili 1974), ácidos nucleicos (Privalov y Filimonov 1978) y biomembranas (Bach y Chapman 1980).

En un experimento de calorimetría diferencial de barrido se registra de forma continua la capacidad calorífica aparente de una disolución de proteína o de cualquier macromolécula en función de la temperatura, obteniéndose lo que comúnmente se denomina termograma (**Fig.8-7**). Éste generalmente está caracterizado por un pico de absorción de calor correspondiente a un proceso o transición térmicamente inducida, por lo que, de acuerdo con el segundo principio de la termodinámica (supuesto el proceso de equilibrio), corresponde a un proceso endotérmico. La información fundamental que proporciona la DSC es la capacidad calorífica relativa de un sistema en función de la temperatura. El procesamiento subsiguiente de esta magnitud nos puede proporcionar una caracterización termodinámica completa del proceso investigado. En el caso de que el proceso de desnaturalización transcurra en equilibrio, es

necesario suponer un modelo (normalmente de dos estados, (Bruylants et al. 2005)) y generalmente, la información que se puede obtener a partir de la DSC es:

1. La capacidad calorífica parcial absoluta del compuesto de interés.
2. Los parámetros termodinámicos globales (los cambios de entalpía [ΔH], de entropía [ΔS], de energía de Gibbs [ΔG] y de la capacidad calorífica [ΔC_p]) asociados a la transición inducida por temperatura.
3. La función de la partición y concomitantemente la población de los estados relevantes del sistema y sus parámetros termodinámicos.

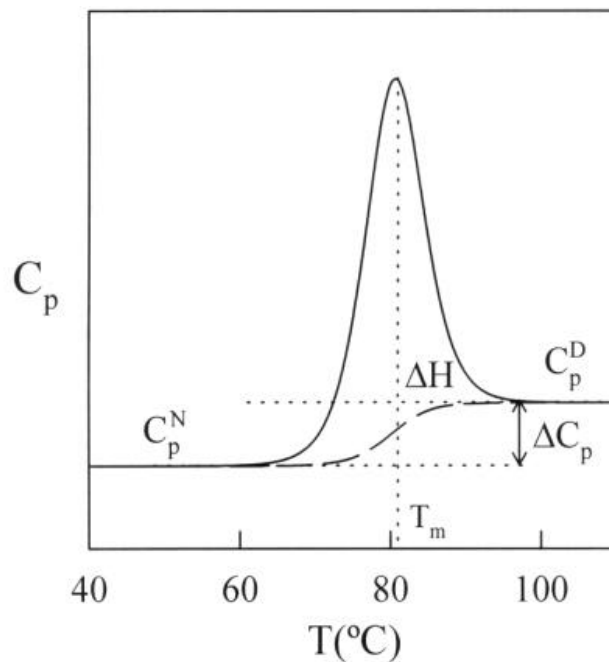


Figura 8-7. Ejemplo de termograma en un experimento de DSC. Curva de capacidad calorífica (trazo continuo) en función de temperatura para la desnaturalización térmica de una proteína hipotética. En trazo discontinuo se representa la capacidad calorífica intrínseca. El área encerrada entre las dos curvas equivale a la entalpía de desnaturalización, ΔH . T_m es la temperatura del máximo de la transición y ΔC_p es el incremento de capacidad calorífica entre el estado nativo (N) y el desplegado (D). Por lo general el termograma de DSC de una proteína es una curva que contiene una transición, en forma de pico endotérmico, que se debe a la absorción de calor asociado con la desnaturalización de la proteína inducida por la temperatura (en el caso de algunas proteínas se obtienen varios picos). Los valores de la señal en la zona pre- y post-transición corresponden respectivamente a las capacidades caloríficas de los estados nativo y desnaturalizado de la proteína. Hay que aclarar que el termograma de barrido con la muestra aparece normalmente por debajo de la línea base debido a que la capacidad calorífica absoluta de la proteína es menor que la del agua que desplaza (Privalov y Khechinashvili 1974).

8.1.1.7. Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*) es una de las técnicas que más ha contribuido a la biología y también recientemente a la nanociencia y la nanotecnología en los últimos años. En microscopía electrónica se trabaja en vacío con el fin de que la trayectoria del haz de electrones no sea desviada. Las interacciones de los electrones con la muestra produce una serie de radiaciones

secundarias; electrones secundarios, electrones transmitidos, radiación X, electrones Auger, catodoluminiscencia, aparte de la energía absorbida por la muestra. La utilización de una u otra nos va a proporcionar diferente información de la muestra, posibilitando el análisis de diferentes tipos de materiales a escala atómica (Williams y Carter 1996a).

Los microscopios electrónicos más sencillos constan de dos o más lentes formadoras de la imagen de forma similar a los microscopios ópticos convencionales. La iluminación proviene de un cañón de electrones emitidos por un filamento de W o LaB₆. Los electrones son acelerados al aplicar un potencial negativo (100 kV-1000 kV) y focalizados mediante dos lentes condensadoras sobre una muestra delgada (en nuestro caso de proteína), transparente a los electrones. Los microscopios de gran resolución (tres lentes generadoras de imagen) son capaces de ampliar la imagen hasta 500.000 veces y tienen poderes de resolución de unas fracciones de nm (Williams y Carter 1996a).

Después de pasar a través de la muestra los electrones son recogidos y focalizados por la lente objetivo dentro de una imagen intermedia ampliada. La imagen es ampliada aún más gracias a las lentes proyectoras, las cuales controlan la ampliación de la imagen en la pantalla fluorescente. La imagen final se proyecta sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica. Existen diferentes modos de formación de la imagen en un microscopio de transmisión: si la imagen se forma a partir del haz transmitido, que no ha sufrido dispersión, entonces la imagen del objeto es oscura sobre un fondo brillante. Si, por el contrario, se utilizan los electrones dispersados en este caso la imagen aparece brillante sobre un fondo oscuro. Por ello estas dos técnicas se denominan formación de imagen en campo claro y en campo oscuro respectivamente. Para la generación de imágenes de macromoléculas, como las proteínas mediante TEM de campo claro, una de las técnicas más usadas es la tinción negativa, en la que se usan sales pesadas de alto número atómico (como el acetato de uranio usado en esta tesis doctoral) que, por tanto, resultan opacas a los electrones transmitidos (Williams y Carter 1996a).

Por otra parte con este microscopio se puede obtener un diagrama de difracción de la muestra, lo que nos aporta una valiosa información sobre la estructura cristalina de la misma. Esto es posible si hacemos incidir el haz de electrones sobre un cristal con un ángulo capaz de satisfacer la ley de Bragg para una determinada distancia entre los planos atómicos d_{hkl} . Ya que la longitud de onda de los electrones es muy pequeña ese ángulo también lo es por lo que el haz debe incidir prácticamente paralelo a los planos reticulares. El diagrama de difracción está formado por los puntos de corte de los haces difractados y transmitido con el plano de la pantalla. Representa, por tanto, la sección de la red recíproca del cristal en el plano normal al haz de electrones (Williams y Carter 1996b).

La posibilidad de combinar la difracción de electrones con los distintos modos de formación de la imagen hace del microscopio de transmisión una de las mejores herramientas en el estudio de la red cristalina y sus defectos.

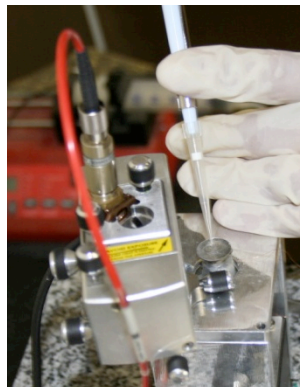
8.1.2. Protocolos experimentales: SMFS y análisis de datos

A continuación se detalla el protocolo específico que seguimos en nuestro laboratorio con un instrumento no comercial que hemos construido (Valpuesta *et al.* 2002).

1. Pegar mediante una cinta adhesiva de doble cara un cubreobjetivos recubierto de oro o de NTA-Ni²⁺ a una chapa metálica. Colocar la chapa sobre los imanes colocados directamente sobre el piezoeléctrico (colocar la chapa horizontalmente pues los imanes pueden desplazar violentamente la chapa y causar la rotura del vidrio pegado).



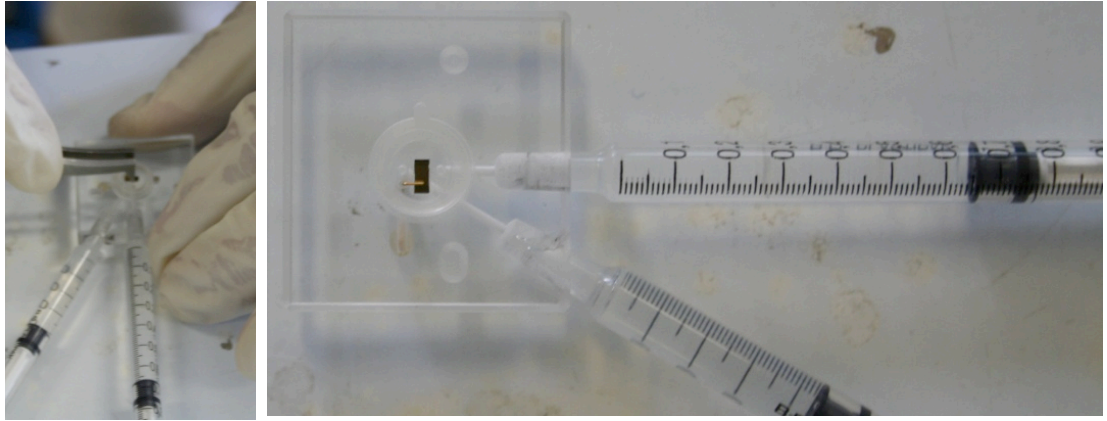
2. Depositar la cantidad deseada de proteína (2-50 μ l) sobre una gota del tampón correspondiente previamente depositada e incubar durante 10-30 minutos (este tiempo es dependiente de la concentración de proteína y del tipo de sustrato).



3. Encender el láser de la siguiente manera: conectar el enchufe al estabilizador de corriente, y posteriormente girar la llave de la fuente del haz para encender el láser (*Schäftner + Kirchhoff*).

4. Encender la electrónica JRC (*JRC Electronics*) y el osciloscopio.

5. Colocar la micropalanca en la celda de fluidos, teniendo en cuenta la orientación de las puntas (finalmente deben apuntar hacia el fotodiodo).

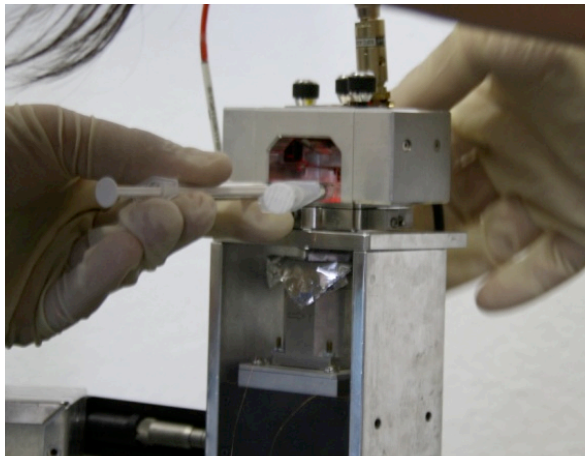


6. Filtrar el volumen del tampón experimental y colocar dos jeringuillas llenas de éste en la celda de fluidos. Hacer fluir tampón a través de la micropalanca para pre-hidratarla. Las jeringuillas deben quedar sobre 0.2 ml al colocar la celda en la cabeza del AFM.



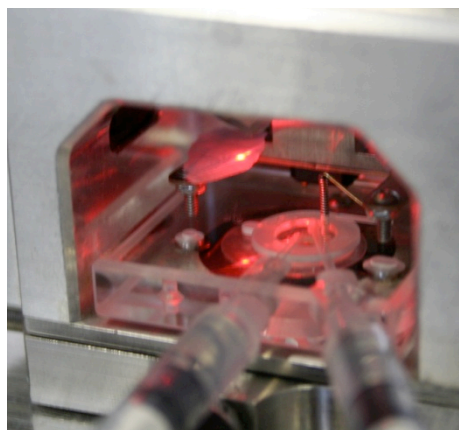
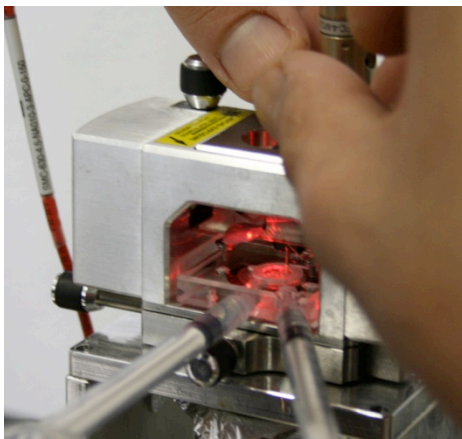
7. Después de la incubación de la muestra sobre el sustrato, lavar 2-3 veces con tampón experimental filtrado para retirar el exceso de muestra que no se haya anclado específicamente al sustrato. Dejar el sustrato con una pequeña capa de líquido.

8. Colocar la cabeza del AFM (*Veeco*), con cuidado del imán sobre el que está el sustrato para no causar colisiones y romper el vidrio con la muestra.



9. Antes de colocar la celda de fluidos, retirar líquido con las jeringuillas para evitar que éste sobrepase el anillo de teflón colocado en la celda. Colocar la celda y ajustarla con los tornillos de la parte trasera de la cabeza. Una vez colocada, rellenar la parte sellada con el anillo de teflón de líquido presionando ligeramente las jeringuillas.

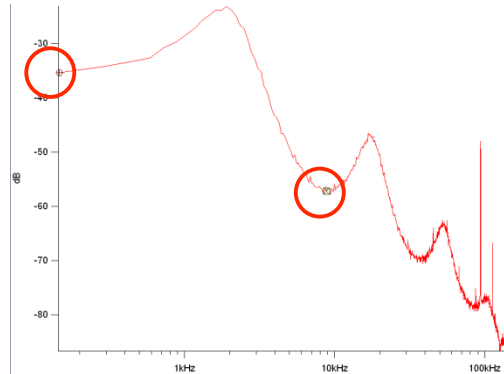
10. Alinear el láser sobre la punta deseada, manipulando los dos tornillos de la parte superior de la cabeza que regulan la pletina sobre la que está colocado el cristal que refleja el haz del láser (uno lo mueve en dirección *x* y el otro en dirección *y*). Sobre un papel puede observarse el patrón de difracción del láser.



11. Empleando la palanca que mueve el espejo del láser y el tornillo que regula la posición del fotodiodo, colocar la señal de entrada en el fotodiodo en máximo de voltaje ($A + B$) y en 0 la posición real de 0 ($A - B/A + B$), estos indicadores se encuentran en la electrónica de *JRC*.

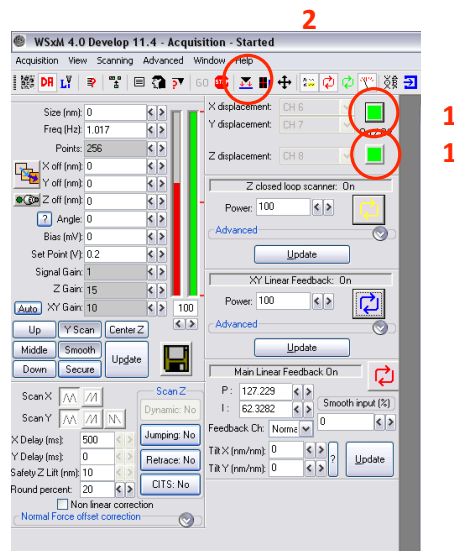
12. Abrir el programa Igor Pro 6.0 (*Wavemetrics*), y compilar los procedimientos adecuados de toma de datos y análisis.

13. Realizar un espectro térmico para poder calibrar después la micropalanca (la superficie está alejada para que la punta resuene libre). Presionar el botón *Power* de Igor hasta que se obtenga un buen espectro. Delimitar con los cursores el pico de resonancia principal de la punta (marcados entre los círculos en la figura).

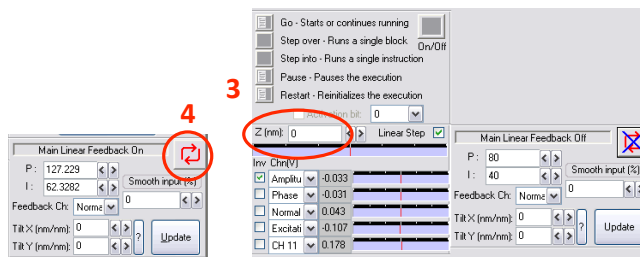


14. Encender la electrónica Dulcinea (*Nanotec Electrónica*) y el controlador PI (*Physik Instrumente*) del piezoeléctrico. Encender el programa WSxM 11.4 (*Nanotec Electrónica*). Seleccionar *DA* y *GO*. Una vez activo, activar los controles externos de corrección de posición y el *feedback* (1).

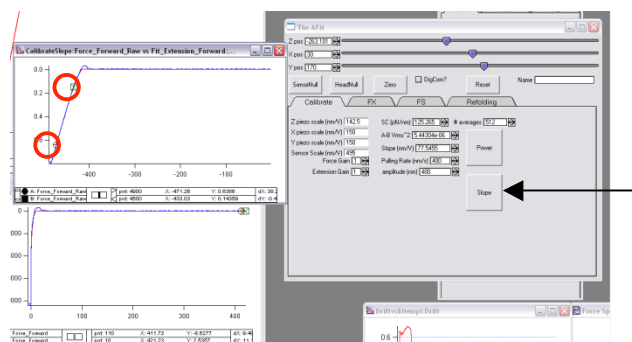
15. Abrir el controlador del motor (2), y seleccionar *Approach*. Revisar cuándo entra en rango el piezoeléctrico por la señal en la caja *JRC* del valor de 0 en el fotodiodo y el movimiento de la señal en el osciloscopio.



16. Una vez entra en rango, deseleccionar el *Main feedback* de WSxM (3). Y registrar la posición dada del piezoeléctrico por WSxM como 0 (4).

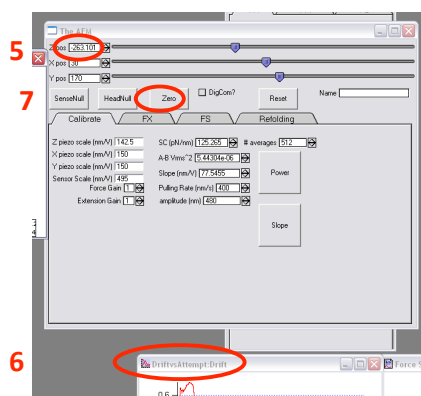


17. Realizar una curva fuerza-extensión de calibración para medir la constante de la micropalanca. Para ello seleccionar el botón *Slope* de Igor (flecha en la figura a continuación). Seleccionar con los cursores A y B una zona donde la traza de ida y la de vuelta se superpongan (marcador mediante círculos en la figura).



18. Cuando se haya calibrado correctamente la micropalanca (su constante debe estar cercana a la nominal y la zona de contacto debe ser recta), ajustar los parámetros de velocidad de estiramiento, fuerza de contacto y longitud de extensión, modo de SMFS, etc. (cada modo tiene una pestaña individual en el panel de Igor) y activar el botón *Go*.

19. Revisar rutinariamente la barra *Z pos* en Igor (5) y la ventana de *drift* (6). Ambos valores pueden corregirse desde el motor de WSxM o moviendo la posición del fotodiodo para volver a tener un 0 de señal (lo que afecta el *drift*). Para ajustar la deriva en Z, alejarse mediante el motor, llevar el valor de *Z pos* a 0, y volver a cercarse hasta entrar en rango.



20. Si se pretende dejar un experimento de SMFS en modo automático durante un intervalo de tiempo largo, activar el botón *Autodetect* que sólo guardará curvas con patrón de picos repetidos (esto evitará la saturación de memoria en el ordenador donde se guardan los experimentos).

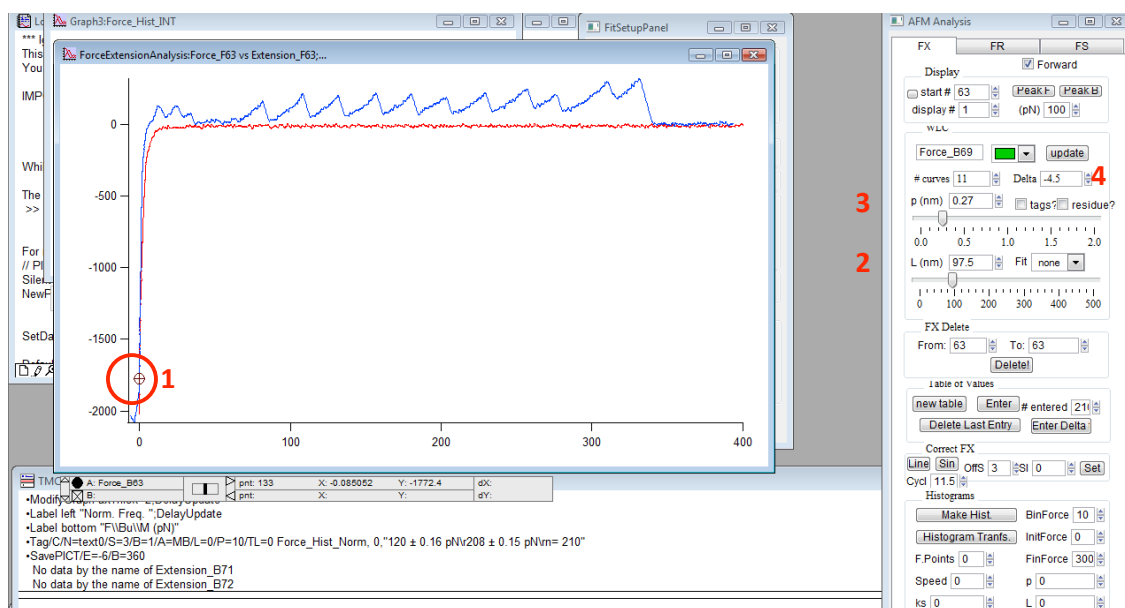
21. Cuando el experimento termina, colocar las posiciones *x*, *y* y *z* de Igor en 0, y accionar el botón *Zero* para borrar los *offsets* (7 en la figura anterior). Seleccionar *End Experiment* del menú y guardar el experimento.

22. En el WSxM alejar mediante el motor el piezoeléctrico para poder quitar sin riesgos la celda y el sustrato.

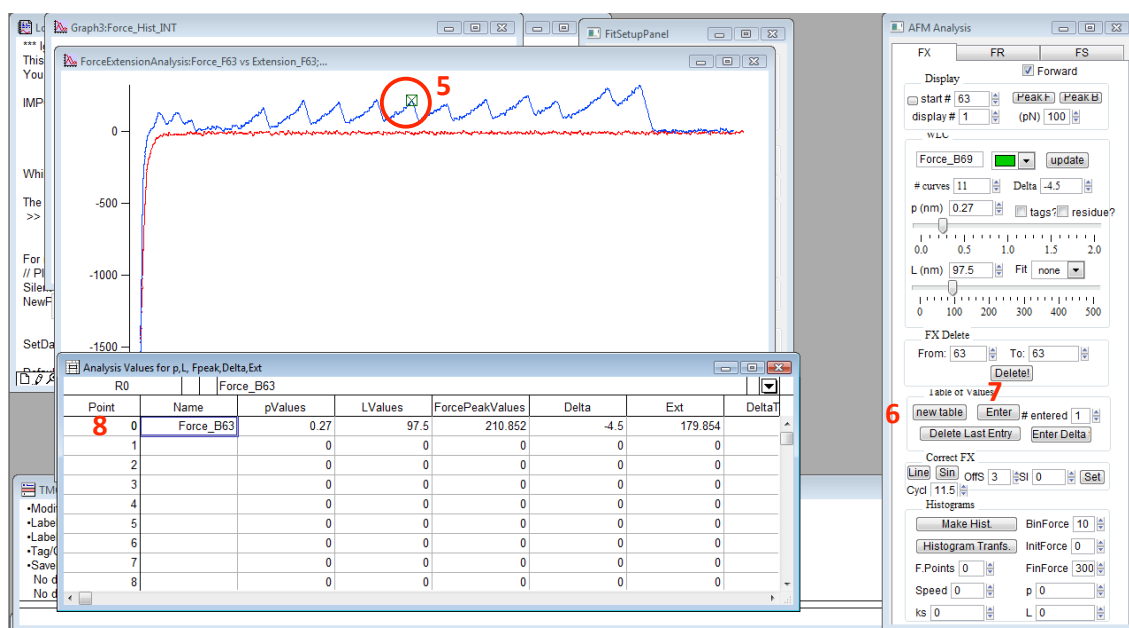
23. Retirar la celda de fluidos y la cabeza del AFM. Lavar la celda después de cada uso. Apagar las electrónicas, primero el controlador PI, luego Dulcinea y finalmente *JRC*. Posteriormente, se puede apagar el osciloscopio y la fuente del láser.

Análisis de datos

1. Abrir el procedimiento de análisis de Igor. Debe analizarse curva por curva. Seleccionar el cursor A en una posición cercana a 0 (1).



2. Los parámetros modificables para ajustar la curva al WLC son la *L* total (2), la *p* (3), y la ΔL_c (4). Una vez comprobado que el pico de fuerza se ajusta a nuestro criterio de selección, colocar el cursor B sobre él (5), seleccionar *New Table* (6), y accionar el botón *Enter* (7). Esto incluirá en la tabla los valores ordenados por curva de F_u , *L*, *p*, y la ΔL_c (8).



3. Al terminar de incluir los valores en la tabla, debe delimitarse por la parte inferior eliminando todas las filas que no contengan valores. Debe cambiarse el signo de la columna de ΔL_c , puesto que siempre incluirá valores negativos (el análisis se hace desde el último pico hasta el primero).

4. Duplicar las columnas de valores sobre las que se quieren hacer los histogramas (habitualmente *ForcePeakValues* y *Delta*, que representa ΔL_c). Si se desea normalizarlas debe duplicarse por partida doble (con nombres diferentes cada vez).

5. Realizar el histograma, con precaución de elegir correctamente la columna de partida y la de destino. Si se desea normalizar, seleccionar integrar, y dividir el histograma por el área bajo la integral en la línea de comandos, para que finalmente ésta sea 1. Representar los histogramas.

6. En la opción *curve fitting* del menú de análisis puede ajustarse el histograma a la función que lo describa más correctamente. Si se tienen suficientes datos, habitualmente el ajuste se realiza a una Gaussiana (aunque ha de tenerse en cuenta que este ajuste es aproximado pues esta función no reproduce fielmente la forma de la distribución).

8.1.3. Reactivos

NOTA: alguno de los reactivos que aparecen a continuación no se muestran explícitamente en el texto, ya que han podido ser empleados en estudios que no aparecen aquí, aunque han sido desarrollados durante el periodo de tesis doctoral.

| Artículo | Proveedor | Referencia | Dirección URL |
|----------------------------|---------------|------------|---|
| REACTIVOS ALMACENADOS A RT | | | |
| Acetato de potasio | Sigma-Aldrich | P 1190 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P1190 SIGMA&N5=SEARC |

| | | | |
|---|---------------|------------|---|
| | | | H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Ácido acético glacial (100%) | Merck | 1000631011 | http://www.merck-chemicals.es/acido-acetico-glacial-100%25/MDA_CHEM-100063/p_uuid |
| Ácido clorhídrico (37%) | Merck | 1003171000 | http://www.merck-chemicals.es/acido-clorhidrico-fumante-37%25/MDA_CHEM-100317/p_uuid |
| Ácido clorhídrico (37 %) | Sigma-Aldrich | H 1758 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=H1758 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Acido nítrico (>90 %) | Sigma-Aldrich | 364576 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=364576 SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Ácido nitrilotriacético (NTA) (99 %) | Sigma-Aldrich | N9877 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=N9877 SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Ácido sulfúrico (100 %) | Sigma-Aldrich | 339741 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=339741 ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Acrilamida 4K - solución (40 %) - mezcla 29 :1 | AppliChem | A0950 | http://applichem.com/en/products/product-detail/as/acrylamid-4k-loesung-40-mix-29-1/ |
| Agar bacteriológico | Pronadisa | 1800 | http://www.condalab.com/ |
| Agarosa D-1 de baja EEO | Pronadisa | 8016 | http://www.condalab.com/ |
| Agarosa de media EEO | AppliChem | A2116 | http://applichem.com/en/products/product-detail/as/agarose-medium-eeo/ |
| Agua | Sigma-Aldrich | W4502 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=W4502 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Agua deuterada (100 %) | Euriso-Top | D214FS | http://www.eurisotop.com/search?searchValue=deuterium oxide |
| Alcohol isopropílico | Sigma-Aldrich | I9030 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=I9030 SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| (3-aminopropil)triethoxilano (APTES) | Sigma-Aldrich | A3648 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A3648 SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Azul de bromofenol | Bio-Rad | 161-0404 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@1762673689.1263764426@@@@&BV_EngineID=cccdadejgghfgicngcfkmdhkkdfm.0&catalogNumber=161-0404&contentDescrip=10+g&nextPage=BRCatalogPage&oid=8585 |
| Bromuro de etidio (solución a 10 mg/ml) | Sigma-Aldrich | E1510 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=E1510 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Cloranfenicol | Calbiochem | 220551 | http://www.merck-chemicals.com/life-science-research/chloramphenicol/EMD_BIO-220551/p_uuid |
| Cloruro de calcio dihidrato (CaCl ₂ · 2H ₂ O) | Sigma-Aldrich | C3306 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=C3306 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |

| | | | |
|---|---------------|----------|---|
| Cloruro de cobre | Sigma-Aldrich | 203149 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=203149 ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Cloruro de guanidinio | Promega | H5381 | http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_151 |
| Cloruro de guanidinio para Biología Molecular | AppliChem | A1106 | http://appliedchem.com/en/products/product-detail/as/guanidinhydrochlorid-fuer-die-molekularbiologie/ |
| Cloruro de magnesio hexahidrato (MgCl ₂ · 6H ₂ O) | Fluka | 63068 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=63068 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Cloruro de manganeso (solución 1M) | Sigma-Aldrich | M1787 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=M1787 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Cloruro de níquel (98 %) | Sigma-Aldrich | 339350 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=339350 ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Cloruro de potasio | Sigma-Aldrich | P9541 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P9541 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Cloruro de sodio | Merck | 106404 | http://www.merck-chemicals.com/sodium-chloride/MDA_CHEM-106404/p_9Yyb.s1LjtQAAAEWC.EfVhTI?WFSimpleSearch_NameOrID=nacl+&BackButtonText=search+results |
| <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i> | Bio-Rad | 161-0400 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@1762673689.1263764426@@@&BV_EngineID=ccccadejgjhfgicfngcfkmdhkkdfm.0&catalogNumber=161-0400&contentDescrip=10+g&nextPage=BRCatalogPage&oid=8582 |
| N, N-Dimetilformamida | Sigma-Aldrich | D4551 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D4551 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | Sigma-Aldrich | D8418 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D8418 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) para PCR | Sigma-Aldrich | D9170 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D9170 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| EDTA | Sigma-Aldrich | E5134 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=E5134 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| EGTA | Sigma-Aldrich | E3889 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=E3889 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Etanol (96 %) | Panreac | 212800 | http://www.panreac.com/new/esp/catalogo/fic-hastec/212800ES.HTM |
| Etanol absoluto | Merck | 100983 | http://www.merck-chemicals.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/en_US/-/-/ViewProductDetail-Start?ProductUUID=gkeb.s1OM5kAAAEW5EQW4z77&PortalCatalogUUID=Uc6b.s1LfzAAAAEW6tyfVhTI |

| | | | |
|--|---------------|--------|---|
| Extracto de levadura | Pronadisa | 170200 | http://www.condalab.com/ |
| Fosfato potásico dibásico (K_2HPO_4) | Panreac | 141512 | http://panreac0.hl78.dinaser.com/spanish/catalogo/fichastec/141512ES.HTM |
| Fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) (100 %) | Sigma-Aldrich | P5655 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P5655 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Fosfato sódico dibásico dihidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (100 %) | Fluka | 71643 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=71643 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Fosfato sódico dibásico heptahidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) (100 %) | Sigma-Aldrich | S9390 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=S9390 SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Fosfato sódico monobásico dihidrato ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) (100 %) | Fluka | 71505 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=71505 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Glicerol (100 %) | Sigma-Aldrich | G 5516 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=G5516 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Glicina | Merck | 500190 | http://www.merck-chemicals.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/en_US/-/-/ViewProductDetail-Start?ProductUUID=wFKb.s1OvAUAAAEW78EW4z8B&PortalCatalogUUID=Uc6b.s1LfzAAAAEW6tYfVhTl |
| D(+)-Glucosa | Panreac | 141341 | http://www.panreac.com/new/esp/catalogo/fichastec/141341ES.HTM |
| D(+)-Glucosa (solución al 10 %) | Sigma-Aldrich | G 8644 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=G8644 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| HEPES | Sigma-Aldrich | H4034 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=H4034 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Hidróxido potásico (100 %) | Sigma-Aldrich | 306568 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=306568 SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Hidróxido sódico (en pellets) | Merck | 106498 | http://www.merck-chemicals.es/sodio-hidroxido/MDA_CHEM-106498/p_uuid |
| Hidróxido sódico en solución (10 M en agua) | Fluka | 72068 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=72068 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Imidazol (100 %) | Sigma-Aldrich | 56748 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=56748 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Isopropanol (100 %) | Sigma-Aldrich | I9516 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=I9516 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Kit de MiniPreps GenElute HP (70 preparaciones) | Sigma-Aldrich | NA0150 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=NA0150 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Leche desnatada en polvo (Sveltesse, | Nestlé | | Comprada en supermercado |

| | | | |
|---|---------------|----------|---|
| Calcio plus, con Bífidos) | | | |
| 2-Mercaptoetanol (100 %) | Sigma-Aldrich | M3148 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=M3148 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| 2-Mercaptoetanol para electroforesis | Bio-Rad | 161-0710 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@1101030452.1263766601@@@@&BV_EngineID=cccfadejgghfhecfnegckmdhkkdflm.0&catalogNumber=161-0710&contentDescrip=25+ml&nextPage=BRCatalogPage&oid=8640 |
| Metanol calidad HPLC | Lab-Scan | C17C11X | http://www.labscan.eu/l_catalogue,1,0 |
| MOPS (100 %) | Sigma-Aldrich | M1254 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=M1254 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| PBS en tabletas | Sigma-Aldrich | P 4417 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P4417 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Peptona de caseína (N-Z-Amine A) de leche bovina | Sigma-Aldrich | C0626 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=C0626 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Perclorato sódico monohidrato (NaClO ₄ · H ₂ O) (100 %) | Fluka | 89152 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=89152 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Peróxido de hidrógeno (30% w/v) | Panreac | 141076 | http://panreac0.hl78.dinaser.com/spanish/catalogo/fichastec/141076ES.HTM |
| Persulfato de amonio (APS) | Bio-Rad | 161-0700 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@1101030452.1263766601@@@@&BV_EngineID=cccfadejgghfhecfnegckmdhkkdflm.0&catalogNumber=161-0700&contentDescrip=10+g+%28for+longer+shelf+life%2C+store+desiccated+at+room+temperature%29&nextPage=BRCatalogPage&oid=8637 |
| PIPES (100 %) | Sigma-Aldrich | P1851 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P1851 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Polietilenglicol (PEG) 8000 | Fluka | 81268 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=81268 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| PureYield™ Plasmid Miniprep System | Promega | A1222 | http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_2177&ckt=1 |
| Reactivo Ellman (Ácido 5,5-Ditiobis-2-nitrobenzoico) | Sigma-Aldrich | D8130 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D8130 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| SDS (99 %) | Sigma-Aldrich | L 4390 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=L4390 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| SDS en solución (20 % en agua) | Fluka | 05030 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=05030 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |

| | | | |
|--|---------------|----------|---|
| Sucrosa (100 %) | Sigma-Aldrich | S0389 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=S0389 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO ₄ · 7H ₂ O) (100 %) | Sigma-Aldrich | M2773 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=M2773 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Sulfato de níquel hexahidrato (NiSO ₄ · 6H ₂ O) | Sigma-Aldrich | N4882 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=N4882 SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Tampón de carga para geles | Sigma-Aldrich | G2526 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=G2526 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Tampón de Laemmli | Bio-Rad | 161-0737 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@1101030452.1263766601@@@@&BV_EngineID=cccfadejgighfhecngcfkmdhkkdfil.0&catalogNumber=161-0737&contentDescrip=30+ml&nextPage=BRCatalogPage&oid=30317 |
| Tampón Tris/Ácido acético/EDTA (TAE) 50x | Bio-Rad | 161-0743 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@0299214757.1263811751@@@@&BV_EngineID=cccdadejglldelkgcfngcfkmdhkkdfil.0&catalogNumber=161-0743&contentDescrip=1+L&nextPage=BRCatalogPage&oid=8667 |
| Tampón Tris/Ácido Bórico/EDTA (TBE) 10x | Bio-Rad | 161-0733 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@0299214757.1263811751@@@@&BV_EngineID=cccdadejglldelkgcfngcfkmdhkkdfil.0&catalogNumber=161-0733&contentDescrip=1+L&nextPage=BRCatalogPage&oid=8657 |
| Tampón Tris/Glicina/SDS (TGS) 10x | Bio-Rad | 161-0772 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@0299214757.1263811751@@@@&BV_EngineID=cccdadejglldelkgcfngcfkmdhkkdfil.0&catalogNumber=161-0772&contentDescrip=5+L+cube&nextPage=BRCatalogPage&oid=33284 |
| TEMED | Bio-Rad | 161-0801 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@1156839956.1263808382@@@@&BV_EngineID=cccadejglldkggcfngcfkmdhkkdfil.0&catalogNumber=161-0801&contentDescrip=50+ml&nextPage=BRCatalogPage&oid=8695 |
| Tetraciclina | Calbiochem | 58346 | http://www.merck-chemicals.com/life-science-research/tetracycline-hydrochloride/EMD_BIO-58346/p_uuid |
| Tinción <i>Bio-Safe Coomassie</i> | Bio-Rad | 161-0786 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@1762673689.1263764426@@@@&BV_EngineID=cccadejgighfgicngcfkmdhkkdfil.0&catalogNumber=161- |

| | | | |
|---|---------------------|----------|---|
| | | | 0786&contentDescrip=1+L&nextPage=BRCatalogPage&oid=8691 |
| 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE) (100 %) | Sigma-Aldrich | 96924 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=96924 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Triptona enzimática de caseína | Sigma-Aldrich | 95039 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=95039 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Tris base (<i>Trizma base</i>) (100 %) | Sigma-Aldrich | T 6066 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=T6066 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich | T8787 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=T8787 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Tween 20 | Bio-Rad | 170-6531 | http://www3.biorad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@0299214757.1263811751@@@@&BV_EngineID=cccdadejglldelkgcfngcfkmdhkkdflf.0&catalogNumber=170-6531&contentDescrip=EIA+grade%2C+100+ml&nextPage=BRCatalogPage&oid=10047 |
| Urea (98 %) | Sigma-Aldrich | U5378 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=U5378 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| REACTIVOS ALMACENADOS EN EL CONGELADOR (-20 °C) | | | |
| Age I (250 unidades) | New England Biolabs | R0552S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0552.asp |
| Anticuerpo anti GST conjugado con peroxidasa producido en conejo | Sigma-Aldrich | A7340 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A7340 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Anticuerpo anti oligómero amiloideo (A11) producido en conejo | Biosource | AHB0052 | http://products.invitrogen.com/ivgn/product/AHB0052?CID=Search-ahb0052 |
| Anticuerpo anti expansiones de poli-glutaminas producido en ratón | Chemicon | MAB1574 | http://www.millipore.com/catalogue/item/mab1574 |
| ATP (96 %) | Sigma-Aldrich | A8937 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A8937 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Ava I (2.000 unidades) | New England Biolabs | R0152S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0152.asp |
| Azul dextrano | Sigma-Aldrich | D4772 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D4772 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| BamH I (50.000 unidades) | New England Biolabs | R0136L | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0136.asp |
| Bgl II (2.000 unidades) | New England Biolabs | R0144S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0144.asp |

| | | | |
|--|---------------------|----------------|---|
| BsiW I (300 unidades) | New England Biolabs | R0553S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0553.asp |
| BssH II (2500 unidades) | New England Biolabs | R0199L | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0199.asp |
| Citocromo C de corazón de vaca (≥ 95 %) | Sigma-Aldrich | C3131 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=C3131 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Cocktail de inhibidores de proteasas (sin EDTA) | Calbiochem | 539134 | http://www.merck-chemicals.es/life-science-research/protease-inhibitor-cocktail-set-iii-edta-free/EMD_BIO-539134/p_saub.s1LzxIAAAEW02EfVhTm?WFSimpleSearch_NameOrID=539134&BackButtonText=search+results |
| Conjunto de dNTPs (100 mM) | Sigma-Aldrich | DNTP100 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=DNTP100 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Deoxirribonucleasa I de páncreas bovino (≥ 80 %) | Sigma-Aldrich | D4527 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D4527 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| DNA polimerasa <i>AccuPrime GC-Rich</i> | Invitrogen | 12337-016 | http://products.invitrogen.com/ivgn/product/12337016?CID=Search-12337-016 |
| DNA polimerasa <i>DYNAzyme II</i> | Finnzymes | F-501 | http://www.finnzymes.com/pdf/F-501.pdf |
| DNA polimerasa <i>Pfu</i> | Fermentas | EP0501 | http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-labeling-detection/enzymes/ep057 |
| DNA polimerasa <i>Phusion Hi-Fi</i> | Finnzymes | F-530 | http://www.finnzymes.com/pdf/F-530.pdf |
| DNA polimerasa Taq (con MgCl ₂) | Sigma-Aldrich | D9307 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D9307 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| DNA polimerasa Taq con tampón ThermoPol (2.000 unidades) | New England Biolabs | M0267I | http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0267.asp |
| Eco RI (10.000 unidades) | New England Biolabs | R0101S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0101.asp |
| <i>Kit</i> de digestión mediante el Factor Xa | Novagen | 69037 | http://www.merck-chemicals.es/life-science-research/factor-xa-cleavage-capture-kit/EMD_BIO-69037/p_uuid |
| Fosfatasa alcalina de gamba (SAP) | Roche | 11 758 250 001 | https://www.rocheappliedscience.com/servlet/StoreFramesetView?langId=1&krypto=azoH5jhJ2MUz73r0cs%2BPdV90cSWJVHwg5U%2F8MIWc8b4kpAjLDRkkDuchkECTAs71n%2F1eThbWxvJH%0A3KKUjcrJjpA86t0nnJCZWb8KNTHXeaYQ3gqb6R4RKN7sqRvotbZJ&ddkey=RCConfigureUser |
| Hemoglobina A ₀ | Sigma-Aldrich | H0267 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=H0267 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Hind III (5.000 unidades) | Fermentas | ER0501 | http://www.fermentas.com/en/products/all/conventional-restriction-enzymes/er050 |
| Insulina de páncreas bovino | Sigma-Aldrich | I6634 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=I6634 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Kas I (250 unidades) | New England Biolabs | R0544S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0544.asp |

| | | | |
|--|---------------------|-----------|---|
| Kit de clonaje TA (20 reacciones) | Invitrogen | K2020-20 | http://www.invitrogen.com/search/index.cfm?fuseaction=google.searchProductMulti&searchterm=K202040&sku=K202040&srchType=GCMSTechResrc_product_multi&requestingFrom=bare |
| Kit de marcadores de proteínas para PAGE no desnaturalizantes | Sigma-Aldrich | MWND500 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=MWND500 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Kit de mutagénesis <i>QuiChange Site-Directed Mutagenesis Kit</i> (30 reacciones) | Stratagene | 200518 | http://www.stratagene.com/products/showProduct.aspx?pid=131 |
| Kpn I (10.000 unidades) | New England Biolabs | R0142L | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0142.asp |
| Lisozima de clara de huevo | Calbiochem | 4403 | http://www.merck-chemicals.es/life-science-research/lysozyme-chicken-egg-white/EMD_BIO-4403/p_3r6b.s1LwvoAAAEWTGIfVhTm?WFSimpleSearch_NameOrID=4403&BackButtonText=search+results |
| Marcador de DNA <i>2-Log DNA Ladder</i> (0.1-10.0 kb) | New England Biolabs | N3200L | http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3200.asp |
| Marcador de DNA <i>Low molecular weight DNA ladder</i> (25-766 pb) | New England Biolabs | N3233S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3233.asp |
| Marcador de proteínas <i>Precision Plus Protein Dual Color Standard</i> (10-250 kDa) | Bio-Rad | 161-0374 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@@1432242797.1263852289@@@@&BV_EngineID=ccchadejgldkdhgcfngcfkmdhkkdfilm.0&catalogNumber=161-0374&contentDescrip=500+%26%23181%3B%2C+50+applications&nextPage=BRCatalogPage&oid=788644 |
| Mezcla de dNTPs (100 mM) | Invitrogen | 10297-018 | http://products.invitrogen.com/ivgn/product/10297018?CID=Search-10297-018 |
| Mlu I (1.000 unidades) | Fermentas | ER0561 | http://www.fermentas.com/en/products/all/conventional-restriction-enzymes/er056 |
| Nco I (1.000 unidades) | New England Biolabs | R0193S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0193.asp |
| Nhe I (1.000 unidades) | New England Biolabs | R0131S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0131.asp |
| Not I (500 unidades) | New England Biolabs | R0189S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0189.asp |
| Pvu II (5.000 unidades) | New England Biolabs | R0151S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0151.asp |
| Ribonucleasa A de páncreas bovino (≥60 %) | Sigma-Aldrich | R4875 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=R4875 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Sal I (1.500 unidades) | Fermentas | ER0641 | http://www.fermentas.com/en/products/all/conventional-restriction-enzymes/er064 |
| SmaI (1.200 unidades) | Fermentas | ER0661 | http://www.fermentas.com/en/products/all/conventional-restriction-enzymes/er066 |
| Solución de vitaminas para | Sigma-Aldrich | B6891 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=B6891 SIGMA&N5=SEARCH |

| | | | |
|---|---------------------|----------|---|
| medio basal <i>Eagle</i> (100x) | | | H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Spe I (500 unidades) | New England Biolabs | R0133S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0133.asp |
| T4 DNA ligasa (20.000 unidades) | New England Biolabs | M0202S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0202.asp |
| T4 DNA ligasa (1000 unidades Weiss) | Fermentas | EL0011 | http://www.fermentas.com/en/products/all/molecular-cloning/enzymes/el001 |
| Xba I (3.000 unidades) | New England Biolabs | R0145S | http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0145.asp |
| X-gal | Sigma-Aldrich | B3928 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=B3928 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Vitamina B ₁₂ | Sigma-Aldrich | V2876 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=V2876 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| REACTIVOS ALMACENADOS EN EL REFRIGERADOR (4 °C) | | | |
| Acrilamida 4K - solución (40 %) - mezcla 29 :1 | Bio-Rad | 161-0146 | http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/jsp/default.do?BV_SessionID=@@@0556519075.1263983979@@@@&BV_EngineID=ccchadejgmkhjlecfnegckmdhkkdfl.0&catalogNumber=161-0146&contentDescrip=29%3A1%2C+500+ml&nextPage=BRCatalogPage&oid=8524 |
| Agarosa para purificación de proteínas con S-tag | Novagen | 69704 | http://www.merck-chemicals.com/life-science-research/s-protein-agarose/EMD_BIO-69704/p_uuid |
| Anticuerpo anti His-tag producido en ratón | Novagen | 70796 | http://www.merck-chemicals.com/life-science-research/his-tag-monoclonal-antibody/EMD_BIO-70796/p_uuid |
| Anticuerpo anti Strep-tag producido en ratón | Novagen | 71591 | http://www.merck-chemicals.com/life-science-research/strep-tag-ii-antibody-hrp-conjugate/EMD_BIO-71591/p_kjmb.s1OqE8AAAEj9xt9.zLX?WFSimpleSearch_NameOrID=71591&BackButtonText=search+results |
| Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa producido en burro | GE Healthcare | NA9340 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=167161 |
| Anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa producido en cabra | GE Healthcare | NA931 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=167161 |
| Betaína (solución 5M) | Sigma-Aldrich | B0300 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=B0300 SIGMA&N5=SEARCH_H_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Carbenicilina | Novagen | 69101-3 | http://www.merck-chemicals.com/life-science-research/carbenicillin/EMD_BIO-69101/p_y_Ob.s1OttcAAAEjlx9.zLX?WFSimpleSearch_NameOrID=carbenicillin&BackButtonText=search+results |

| | | | |
|--|---------------|------------|---|
| Cloruro de zinc (solución 0.1 M) | Sigma-Aldrich | 39059 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=39059 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Columnas de FPLC de purificación por afinidad de GST GStrap FF (2 unidades de 1 ml) | GE Healthcare | 17-5130-02 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/NewSearch_Result2?OpenDocument&QueryString=qgstrap%20AND%20ffq&SearchKeywords=products&addon=fuzzy&timestep=1263986207078&type=site |
| Columnas de FPLC de purificación por afinidad de Ni ²⁺ Histrap HP (5 unidades de 1 ml) | GE Healthcare | 17-5247-01 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp010ent/Products?OpenDocument&parentid=525604&moduleid=165701&zone=Labsep |
| Columnas de FPLC de intercambio aniónico HiTrap Q HP (5 unidades de 1 ml) | GE Healthcare | 17-1153-01 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp010ent/Products?OpenDocument&parentid=553&moduleid=9391&zone=Labsep |
| Columnas de FPLC de intercambio catiónico HiTrap SP HP (5 unidades de 1 ml) | GE Healthcare | 17-1151-01 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp010ent/Products?OpenDocument&parentid=553&moduleid=9391&zone=Labsep |
| Columnas de FPLC de purificación por afinidad de <i>Strep-tag</i> Strep-trap HP (5 unidades de 1 ml) | GE Healthcare | 28-9075-46 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp010ent/Products?OpenDocument&moduleid=167321 |
| d-Desthiobiotina | Sigma-Aldrich | D1411 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=D1411 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| DTT | Fermentas | R0862 | http://www.fermentas.com/en/products/all/reagents/r086 |
| Fenol equilibrado, no estabilizado (81 %) | AppliChem | A0971 | http://www.applichem.de/en/products/product-detail/as/phenol-equilibriert-nicht-stabilisiert/ |
| Fenol : cloroformo : isoamilalcohol 25 : 24 : 1 | Fluka | 77617 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=77617 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Ferritina Tipo I de bazo de caballo | Sigma-Aldrich | F4503 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F4503 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Formamida (100 %) | Sigma-Aldrich | F9037 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F9037 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| IPTG | Fermentas | R0392 | http://www.fermentas.com/en/products/all/reagents/r117 |
| Kit de preparación de células de <i>E. coli</i> Z-competentes | Zymo Research | T3002 | http://www.zymoresearch.com/content/z-competent-e-coli-transformation-kit-buffer-set-t3001-t3002 |
| Lactoferrina de leche de vaca (~90 %) | Sigma-Aldrich | L9507 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=L9507 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| L-Glutation oxidado (~98 %) | Sigma-Aldrich | G4501 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=G4501 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |

| | | | |
|---|----------------|---------|---|
| L-Glutation reducido ($\geq 97\%$) | Sigma-Aldrich | 49750 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=49750 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| PMSF (solución a 0.1 M) | Sigma-Aldrich | 93482 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=93482 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Reactivos de detección ECL Plus™ | GE Healthcare | RPN2132 | http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=46854 |
| Reactivo de Ellman modificado - sal de ácido 5-(Octilditio)-2-nitrobenzoico | Sigma-Aldrich | 75050 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=75050 FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Reactivo de tinción de geles PAGE EZBlue | Sigma-Aldrich | G1041 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=G1041 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |
| Resina de purificación de DNA plasmídico Milk Pure Gen | | | Donación del Dr. Álvaro Villaroel |
| Resina de purificación por afinidad de Co^{2+} Talon | BD Biosciences | 635502 | http://www.bdbeurop.com/cgi-bin/bd/bd/bdc_common/edshowchannelprogram.jsp?OID=214198&Program=CONTEXTLIST&cntType=PRODUCT&BV_UseBVCookie=yes&BD_SID=UWtSQzpNQTO9Ojo%3d&PrevPage=PRODUCT |
| BSA ($\geq 96\%$) | Sigma-Aldrich | A4503 | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A4503 SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&F=SPEC |

Direcciones de empresas:

- *Bio-Rad*: California, USA (www.bio-rad.com).
- *BioSource*: California, USA (<http://www.invitrogen.com>).
- *Bruker BioSpin*: Rheinstetten, Alemania (<http://www.bruker-biospin.com/>).
- *Calbiochem*: Darmstadt, Alemania (<http://www.merck-chemicals.com/life-science-research>).
- *Clontech*: California, USA (<http://www.clontech.com/>).
- *Fermentas*: Maryland, USA (<http://www.fermentas.com>).
- *Finnzymes*: Espoo, Finlandia (<http://www.finnzymes.com/>).
- *GE Healthcare*: Little Chalfont, UK (<http://www.gehealthcare.com/>).
- *Invitrogen*: San Diego, USA (<http://www.invitrogen.com>).
- *JASCO Incorporated*: Maryland, USA (<http://www.jascoinc.com>).
- *Jena Bioscience*: Jena, Alemania (<http://www.jenabioscience.com/>).
- *Jeol Limited*: Tokio, Japón (<http://www.jeol.com/>).
- *JRC Electronics*: Margate, UK (<http://jrcelectronics.co.za/>).
- *Laboratorios Conda*: Madrid, España (<http://www.condalab.com/>).
- *Millipore*: Massachusetts, USA (<http://www.millipore.com/>).
- *Nanotec Electrónica*: Madrid, España (<http://www.nanotec.es/>).
- *New England Biolabs*: Massachusetts, USA (<http://www.neb.com>).
- *Novagen*: Darmstadt, Alemania (<http://www.merck-chemicals.com/life-science-research>).
- *Olympus*: Tokio, Japón (<http://www.olympus.com>).
- *Physik Instrumente*: Karlsruhe, Alemania

(<http://www.physikinstrumente.com/>).

- *Promega*: Wisconsin, USA (<http://www.promega.com/>).
- *Qiagen*: Duesseldorf, Alemania (<http://www1.qiagen.com/>).
- *Quorum Technologies*: West Sussex, UK (<http://www.quorumtech.com/>).
- *Roche*: Basilea, Suiza (<http://www.roche.com>).
- *Schäftner + Kirchhoff*: Hamburgo, Alemania (<http://www.sukhamburg.de>).
- *Secugen*: Madrid, España (<http://www.secugen.es/>).
- *Sigma-Aldrich*: Missouri, USA (<http://www.sigmaaldrich.com>).
- *SpectrumLabs*: California, USA (<http://www.spectrapor.com/>).
- *Stratagene*: Texas, USA (<http://www.stratagene.com>).
- *Ted Pella*: California, USA (<http://www.tedpella.com/>).
- *Thermo Scientific*: Delaware, USA (<http://www.thermo.com/>).
- *Veeco*: Nueva York, USA (<http://www.veeco.com/>).
- *Wavemetrics*: Oregón, USA (<http://www.wavemetrics.com/>).
- *Zymo Research*: California, USA (<http://www.zymoresearch.com/>).

8.1.4. Glosario de anglicismos y expresiones abreviadas

Los compuestos químicos se mencionan de acuerdo a la nomenclatura IUPAC (<http://www.iupac.org/>). Salvo que se especifique lo contrario, los aminoácidos se simbolizan mediante el código de una letra. Las medidas de parámetros físicos se expresan en unidades de Sistema Internacional (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>).

Glosario de anglicismos

Backup o stock: alícuota de un clon (DNA puro y/o bacteria transformada conteniéndolo) con la secuencia correcta verificada que se guarda a -80°C para su almacenamiento.

Coarse-grain: método de simulación en el que sólo se cuantifican los contactos entre aminoácidos separados como mucho por un aminoácido intermedio.

Cantilever: micropalanca del AFM.

Crosslinking: anclaje covalente de las proteínas mediante un reactivo químico.

Drift: deriva sufrida por el piezoeléctrico por inestabilidad térmica que genera un desplazamiento entre dos líneas consecutivas de la imagen escaneada, introduciendo artefactos en la topografía.

Feedback: circuito de retro-alimentación que se aplica al piezoeléctrico del AFM para que mantenga constante la tensión sobre la micropalanca tras un descenso en la F mediante un incremento de la distancia con respecto a la micropalanca.

Force-clamp: modo de SMFS en el que se estira a una fuerza constante.

Force-ramp: modo de SMFS en el que se estira a una fuerza constantemente aumentada.

Full-length: especie de la proteína completa.

His-tag: etiqueta (grupo químico) de purificación y/o detección de las proteínas que consta de una secuencia de poli-histidinas que posee una alta afinidad por Ni²⁺.

Jumping: método de imagen por AFM que consiste en el registro en cada punto de la superficie de la fuerza y la adhesión para generar los mapas de topografía, de adhesión y de rigidez. Este método opera en el régimen de contacto intermitente.

Length-clamp: modo de SMFS en el que se estira una extensión constante.

Loop: secuencia sin estructura secundaria incluida dentro de un módulo de proteína con estructura terciaria que conecta elementos de estructura secundaria.

Random coil: conformación desestructurada o de “ovillo estadístico” de las proteínas.

Screening: examen de detección en múltiples condiciones experimentales.

Setpoint: valor de fuerza introducido por el usuario como referencia para que funcione la retroalimentación del piezoeléctrico y no se dañe el espécimen durante el escaneo con la punta.

Strep-tag: etiqueta (grupo químico) de purificación y/o detección de las proteínas que consta de una secuencia de aminoácidos con afinidad por la estreptavidina.

Tag: etiqueta química existente en las proteínas para su purificación o detección mediante sistemas de afinidad.

Tapping: método de imagen por AFM que consiste en la transformación de las variaciones de frecuencia o amplitud de resonancia de la micropalanca en cambios topográficos. Este método opera en el régimen de no-contacto.

Western-blot: inmunoblot.

Expresiones abreviadas

Clonaje: Por simplicidad, en esta tesis este término se refiere estrictamente a clonaje molecular. También por mayor simplicidad hablamos de “clonaje molecular de las proteínas”, cuando debería decirse obviamente “clonaje molecular de las secuencias de DNA que codifican para las proteínas”.

Mutación: A lo largo de todo el texto, se mencionan varias mutaciones, las cuales son descritas como mutaciones en proteínas. Esto se hace así por simplicidad, ya que obviamente debería hablarse de mutaciones en los genes que codifican para dichas proteínas.

8.1.5. Índice de figuras y tablas

Figura 1-1. Paisaje energético para el plegamiento proteico, según la hipótesis del control termodinámico.

Figura 1-2. Controversia entre la hipótesis termodinámica vs. cinética.

Figura 1-3. Representación esquemática bidimensional de la energía en la ruta de plegamiento.

Figura 1-4. Embudos representando un paisaje energético de plegamiento ideal (a) o un paisaje energético de plegamiento rugoso (b), con trampas cinéticas (c).

Figura 1-5. Proteínas intrínsecamente desordenadas.

Figura 1-6. Trinidad Proteica.

Figura 1-7. Proporción y funcionalidad de IDPs en el proteoma eucariota.

Figura 1-8. Enfermedades neurodegenerativas causadas por mal plegamiento y agregación como causa molecular común.

Figura 1-9. Patogénesis molecular de las enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas.

Figura 1-10. Modelo de la estructura del núcleo de una fibra amiloide.

Figura 1-11. Modelo del complejo QBP1-polyQ.

Figura 1-12. Técnicas monomoleculares vs. poblacionales.

Figura 1-13. El microscopio de fuerzas atómicas.

Figura 1-14. Espectros fuerza-extensión en SMFS.

Figura 1-15. Parámetros cinéticos del desplegamiento mecánico.

Figura 1-16. Representación de eventos relacionados con un espectro fuerza-extensión típico.

Figura 1-17. Desplegamiento mecánico de una proteína modular.

Figura 4-1. Enfoque de heteropoliproteína estándar (en serie) para el análisis nanomecánico de polyQs.

Figura 4-2. Estrategia de la proteína portadora basada en el pFS-2.

Figura 4-3. Estabilidad termodinámica de la proteína portadora tras la inserción del huésped.

Figura 4-4. Análisis por CD de las proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas.

Figura 4-5. Análisis por NMR de las proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas.

Figura 4-6. Análisis por turbidimetría de las proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas.

Figura 4-7. Ensayo de unión de Rojo Congo.

Figura 4-8. Propiedades electroforéticas de los agregados de α -syn.

Figura 4-9. Análisis por TEM e iAFM de las proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas.

Figura 4-10. Predicciones intrínsecas de desorden para las poliproteínas, proteínas de fusión mínima y proteínas aisladas.

Figura 4-11. Análisis nanomecánico de NPs mediante la estrategia “portador-huésped” basada en pFS-2.

Figura 4-12. Análisis nanomecánico de diferentes trectos de polyQs y una IDP no amiloidogénica (VAMP2).

Figura 4-13. Falta de correlación entre F_u e ΔL_c .

Figura 4-14. Análisis nanomecánico de $A\beta_{42}$.

Figura 4-15. Análisis nanomecánico de α -syn.

Figura 4-16. Análisis nanomecánico de Sup35NM.

Figura 4-17. Efecto de formas familiares de enfermedades y QBP1 sobre el número de regiones estructuradas por molécula.

Figura 4-18. Eventos putativos adicionales.

Figura 4-19. Hipótesis mecánica y posible relación con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas amiloidogénicas.

Figura 8-1. La punta del sensor del AFM.

Figura 8-2. Fundamento físico del funcionamiento del AFM.

Figura 8-3. Modo de salto “*jumping mode*” en líquido.

Figura 8-4. Replegamiento de una molécula de poliproteína de ubiquitina monitorizada en tiempo real mediante force-clamp.

Figura 8-5. Adquisición de imágenes *quasi*-simultáneas a SMFS y estrategia de experimentos de SMFS intermolecular.

Figura 8-6. Fenómeno de NMR.

Figura 8-7. Ejemplo de termograma en un experimento de DSC.

Tabla 1. Resumen de oligonucleótidos utilizados para el diseño del pFS-2 y para el clonaje de las diferentes proteínas huéspedes.

Tabla 2. Estabilidad mecánica (F_u) de las proteínas portadoras tras la inserción de la proteína huésped.

Tabla 3. Resumen de controles estructurales, de agregación y fibrillogénesis.

Tabla 4. Resumen del análisis nanomecánico de NPs mediante SMFS.

Tabla 5. Eventos putativos y número de regiones estructuradas por molécula.

8.2. Publicaciones y patentes derivadas

(* Publicaciones directamente relacionadas con esta tesis doctoral).

1. Carrión-Vázquez M, Oberhauser AF, Díez H, **Hervás R**, Oroz J, Fernández J, and Martínez-Martín D (2006) Protein nanomechanics – As studied by AFM Single-Molecule Force Spectroscopy. En: Arrondo J.L.R., and Alonso A. (eds) Advanced Techniques in Biophysics. Springer-Verlag, Heidelberg, 163-245.

El objetivo de esta revisión es proporcionar a los lectores no especialistas una guía rápida para que pueda familiarizarse con los temas centrales del campo. En ella se discuten los principales conceptos, ideas, logros, implicaciones biológicas y limitaciones de la técnica. Se hace especial énfasis en el análisis de las interacciones intramoleculares de proteínas y también se indican las ventajas de combinar esta técnica con la ingeniería de proteínas y dinámica molecular, con el fin de dilucidar los factores moleculares determinantes que subyacen a la estabilidad mecánica de las proteínas.

Protein Nanomechanics – as Studied by AFM Single-Molecule Force Spectroscopy

Springer Series in Biophysics
J.L.R. Arrondo and A. Alonso
Advanced Techniques in Biophysics
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006

MARIANO CARRIÓN-VÁZQUEZ, ANDRÉS F. OBERHAUSER, HÉCTOR DÍEZ,
RUBÉN HERVÁS, JAVIER OROZ, JESÚS FERNÁNDEZ, DAVID MARTÍNEZ-MARTÍN

I am inspired by the biological phenomena in which chemical forces
are used in repetitious fashion to produce all kinds of weird effects
(one of which is the author).

*Richard Feynman,
1959 talk at the CalTech (Feynman 1960)*

2. Valbuena A, Oroz J, **Hervás R**, Vera AM, Rodríguez D, Menéndez M, Sulkowska JI, Cieplak M and Carrión-Vázquez M (2009) On the remarkable robustness of scaffoldins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (33):13791-6.

Factor de Impacto (5 años): 10.6

Este trabajo revela los módulos de cohesina (que forman parte de las scaffoldinas) como las estructuras mecánicamente más estables de proteínas con plegamiento nativo hasta la fecha. Además, se establece el “parche mecánico” como un motivo generalizado en proteínas mecánicas. Además, esta es una prueba contundente de la capacidad predictiva de los modelos de simulaciones de dinámica molecular coarse-grained.

On the remarkable mechanostability of scaffoldins and the mechanical clamp motif

Alejandro Valbuena^a, Javier Oroz^a, Rubén Hervás^a, Andrés Manuel Vera^a, David Rodríguez^a, Margarita Menéndez^b, Joanna I. Sulkowska^c, Marek Cieplak^c, and Mariano Carrión-Vázquez^{a,1}

^aInstituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Avenida Doctor Arce 37, E-28002 Madrid, Spain; ^bInstituto de Química-Física Rocasolano, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Respiratorias (CibeRes), Serrano 119, E-28006 Madrid, Spain; and ^cInstitute of Physics, Polish Academy of Sciences, Aleja Lotników 32/46, 02668 Warsaw, Poland

Edited by Carlos J. Bustamante, University of California, Berkeley, CA, and approved June 30, 2009 (received for review December 22, 2008)

Protein mechanostability is a fundamental biological property that can only be measured by single-molecule manipulation techniques. Such studies have unveiled a variety of highly mechanostable modules (mainly of the Ig-like, β -sandwich type) in modular proteins subjected to mechanical stress from the cytoskeleton and the metazoan cell–cell interface. Their mechanostability is often attributed to a “mechanical clamp” of secondary structure (a patch of backbone hydrogen bonds) fastening their ends. Here we investigate the nanomechanics of scaffoldins, an important family of scaffolding proteins that assembles a variety of cellulases into the so-called cellulosome, a microbial extracellular nanomachine for cellulose adhesion and degradation. These proteins anchor the microbial cell to cellulose substrates, which makes their connecting region likely to be subjected to mechanical stress. By using single-molecule force spectroscopy based on atomic force microscopy, polyprotein engineering, and computer simulations, here we show that the cohesin I modules from the connecting region of cellulosome scaffoldins are the most robust mechanical proteins studied experimentally or predicted from the entire Protein Data Bank. The mechanostability of the cohesin modules studied correlates well with their mechanical kinetic stability but not with their thermal stability, and it is well predicted by computer simulations, even coarse-grained. This extraordinary mechanical stability is attributed to 2 mechanical clamps in tandem. Our findings provide the current upper limit of protein mechanostability and establish shear mechanical clamps as a general structural/functional motif widespread in proteins putatively subjected to mechanical stress. These data have important implications for the scaffoldin physiology and for protein design in biotechnology and nanotechnology.

mechanostability is often attributed to a “mechanical clamp” of secondary structure that fastens their ends and, to date, Ig modules appear to be among the most mechanically stable ones.

Here we have investigated the nanomechanics of scaffoldins (Fig. 1), a family of microbial modular proteins that are particularly motivating from the mechanical point of view for 3 reasons: (i) Scaffoldins are noncatalytic structural proteins of the cellulosome, a multienzyme, cell-surface complex required for adhesion and degradation of crystalline cellulose, a particularly recalcitrant substrate (Fig. 1A). These scaffolding proteins act as a molecular Lego, binding a number of cellulases through its type I cohesin (cohesin I) modules to spatiotemporally regulate the efficiency of the entire enzymatic cascade (6). Furthermore, they physically anchor the microbial cell (6, 7) to the crystalline cellulose substrate (8), although the quaternary structure of the model cellulosomes, including their linkages to the cell and substrate, is highly polymorphic and not yet well resolved (Fig. 1A; ref. 6). The bonds joining the scaffoldin system are very tenacious, which include several of the highest affinity, noncovalent bonds known in nature [interestingly, one such bond in some scaffoldins is even covalent (9)], suggesting that they may be part of a stable mechanical circuit (Fig. 1A). Like in cell adhesion proteins from metazoans (5), we hypothesize that under physiological conditions, the scaffoldin region located between the 2 key attachment points (cell and substrate) might be exposed to a greater axial mechanical stress. We call this the “connecting region,” which is a segment putatively subjected to a more intense mechanical stress than the rest of the protein, referred to as the “hanging region”. (ii) The cohesin I modules

3. Galera-Prat A, Hermans R, **Hervás R**, Gómez-Sicília A and Carrión-Vázquez M (2012) Single Molecule Force Spectroscopy. En: Baró AM & Reifengerger RG (eds) Atomic Force Microscopy in Liquid. Willey-VCH.

Esta revisión introduce los conceptos básicos de SMFS, haciendo especial énfasis en los criterios que se han de seguir para identificar eventos monomoleculares de forma inequívoca. Se enfoca generalmente en las aplicaciones biológicas que aporta la técnica para el estudio de proteínas, aunque también se menciona la aplicación de SMFS a otro tipo de biopolímeros.

6

Single-Molecule Force Spectroscopy

Albert Galera-Prat, Rodolfo Hermans, Rubén Hervás, Àngel Gómez-Sicília, and Mariano Carrión-Vázquez

Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications, First Edition.

Edited by Arturo M. Baró and Ronald G. Reifengerger.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2012 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

6.1

Introduction

This chapter aims to introduce the main concepts of single-molecule force spectroscopy (SMFS) by atomic force microscopy (AFM), essentially focusing on the basic methodology and its most relevant biological applications. Special emphasis will be paid to the criteria used to identify true single-molecule events (the basis of obtaining meaningful data and interpreting it correctly), as well as the main achievements of the technique. More specialized information with details of the experiments can be found in other reviews [1–4].

Since AFM-based SMFS has been so far mainly applied to proteins, this chapter focuses mostly on protein mechanics, although a short account on its application to other biopolymers can be found in Section 6.4.

The field of protein nanomechanics has made progress in three different fronts: intramolecular interactions (protein folding and unfolding), intermolecular interactions (protein–biomolecule), and membrane protein extraction (where intramolecular and intermolecular interactions occur simultaneously). This chapter is mainly focused in intramolecular studies, for which unambiguous single-molecule markers have been developed. In the case of intermolecular interactions, internal single-event markers are not yet available, while in mechanical extraction of membrane proteins, their unfolding and membrane unbinding cannot be easily decoupled.

***4. Oroz J, Hervás R and Carrión-Vázquez M (2012) Unequivocal Single-Molecule Force Spectroscopy of Proteins by AFM using pFS Vectors. Biophys J 102:682-690.**

Factor de Impacto (5 años): 4.137

En la actualidad, el análisis nanomecánico de proteínas mediante espectroscopía de fuerzas de molécula individual basada en la microscopía de fuerzas atómicas está siendo ampliamente utilizada para investigar numerosos procesos celulares, como el plegamiento de proteínas o el funcionamiento interno de proteínas mecánicas. Sin embargo, este tipo de estudios están limitados por una serie de problemas técnicos. Entre ellos, podemos mencionar el ruido en la zona proximal del espectro fuerza-extensión, la dificultad de identificar verdaderos eventos de molécula individual, así como varios problemas a la hora de preparar una muestra pura y de alta calidad para llevar a cabo tales experimentos. Con el fin de solventar estas limitaciones, hemos diseñado una familia de vectores de clonaje/expresión, la familia pFS (plasmid for Force Spectroscopy), que presentan una serie de ventajas que hacen de él un sistema versátil y robusto que permite el análisis inequívoco de proteínas que presentan baja estabilidad mecánica y/o complejos espectros de fuerza/extensión. Un ejemplo característico es el caso de un grupo de proteínas con importantes implicaciones tanto biológicas como clínicas. Estas proteínas son conocidas como proteínas intrínsecamente desordenadas, que dada su tendencia a agregar, son muy difíciles de caracterizar mediante técnicas poblacionales. En este trabajo se ponen de manifiesto las ventajas y aplicaciones de esta nueva familia de vectores a través del análisis de proteínas representativas.

Unequivocal Single-Molecule Force Spectroscopy of Proteins by AFM Using pFS Vectors

Javier Oroz, Rubén Hervás, and Mariano Carrión-Vázquez*

Instituto Cajal/CSIC, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, and IMDEA Nanociencia, Madrid, Spain

ABSTRACT Nanomechanical analysis of proteins by single-molecule force spectroscopy based on atomic force microscopy is increasingly being used to investigate the inner workings of mechanical proteins and substrate proteins of unfoldase machines as well as to gain new insight into the process of protein folding. However, such studies are hindered by a number of technical problems, including the noise of the proximal region, ambiguous single-molecule identification, as well as difficulties in protein expression/folding and full-length purification. To overcome these major drawbacks in protein nanomechanics, we designed a family of cloning/expression vectors, termed pFS (plasmid for force spectroscopy), that essentially has an unstructured region to surmount the noisy proximal region, a homomeric polyprotein marker, a carrier to mechanically protect the protein of interest (only the pFS-2 version) that also acts as a reporter, and two purification tags. pFS-2 enables the unambiguous analysis of proteins with low mechanical stability or/and complex force spectra, such as the increasingly abundant class of intrinsically disordered proteins, which are hard to characterize by traditional bulk techniques and have important biological and clinical implications. The advantages, applications, and potential of this ready-to-go system are illustrated through the analysis of representative proteins.

***5. Hervás R, Oroz J, Galera-Prat A, Goñi O, Valbuena A, Vera AM, Gómez-Sicilia A, Losada-Urzáiz F, Uversky V, Menéndez M, Laurents DV, Bruix M, Carrión-Vázquez M (2012). Common features at the start of the neurodegeneration cascade. PLoS Biol. 10(5): e1001335. doi:10.1371/journal.pbio.1001335.**

Factor de Impacto (5 años): 14.375

Las enfermedades neurodegenerativas actualmente constituyen uno de los problemas sociales más importantes a nivel de salud. Generalmente, son causados por proteínas específicas, total o parcialmente desordenadas. Sin embargo, el mecanismo molecular que subyace a todas estas enfermedades no se conoce. Según una de las hipótesis más aceptadas, un cambio conformacional crítico en el monómero de estas proteínas neurotóxicas desencadena la cascada patogénica. Aquí, usamos la espectroscopía de fuerzas y una novedosa metodología para identificar de manera inequívoca eventos de molécula individual, para demostrar el rico polimorfismo conformacional presente en los monómeros de cuatro proteínas neurotóxicas representativas. Este polimorfismo correlaciona con amiloidosis y neurotoxicidad de tal forma que está ausente en un mutante que no presenta capacidad de fibrilar, está favorecido por formas familiares de enfermedad y disminuido por un inhibidor promiscuo del cambio conformacional crítico, neurotoxicidad y neurodegeneración in vivo. Además, postulamos que conformeros mecanoestables específicos pueden estar relacionados con el inicio de la enfermedad, siendo por tanto interesantes dianas terapéuticas y de diagnóstico precoz. La demostrada capacidad para inhibir la heterogeneidad conformacional de esas proteínas por un único agente farmacológico revela características comunes a nivel de monómero en las proteínas neurotóxicas y sugiere una fórmula común para diagnosticar, prevenir, detener, o invertir múltiples enfermedades neurodegenerativas con un mismo fármaco.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS BIOLOGY

Common Features at the Start of the Neurodegeneration Cascade

Rubén Hervás^{1,2,3}, Javier Oroz^{1,2,3}, Albert Galera-Prat^{1,2}, Oscar Goñi^{1,2}, Alejandro Valbuena^{1,2}, Andrés M. Vera^{1,2}, Àngel Gómez-Sicilia^{1,2}, Fernando Losada-Urzáiz^{1,2}, Vladimir N. Uversky^{3,4}, Margarita Menéndez⁵, Douglas V. Laurents⁶, Marta Bruix⁶, Mariano Carrión-Vázquez^{1,2*}

1 Instituto Cajal, IC-CSIC & Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, 2 Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA-Nanociencia), Madrid, Spain, 3 University of South Florida, College of Medicine and Byrd Alzheimer's Research Institute, Tampa, Florida, United States of America, 4 Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia, 5 Instituto de Química-Física Rocasolano, IQFR-CSIC & Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain, 6 Instituto de Química-Física Rocasolano, IQFR-CSIC, Madrid, Spain

Abstract

Amyloidogenic neurodegenerative diseases are incurable conditions with high social impact that are typically caused by specific, largely disordered proteins. However, the underlying molecular mechanism remains elusive to established techniques. A favored hypothesis postulates that a critical conformational change in the monomer (an ideal therapeutic target) in these "neurotoxic proteins" triggers the pathogenic cascade. We use force spectroscopy and a novel methodology for unequivocal single-molecule identification to demonstrate a rich conformational polymorphism in the monomer of four representative neurotoxic proteins. This polymorphism strongly correlates with amyloidogenesis and neurotoxicity: it is absent in a fibrillization-incompetent mutant, favored by familial-disease mutations and diminished by a surprisingly promiscuous inhibitor of the critical monomeric β -conformational change, neurotoxicity, and neurodegeneration. Hence, we postulate that specific mechanostable conformers are the cause of these diseases, representing important new early-diagnostic and therapeutic targets. The demonstrated ability to inhibit the conformational heterogeneity of these proteins by a single pharmacological agent reveals common features in the monomer and suggests a common pathway to diagnose, prevent, halt, or reverse multiple neurodegenerative diseases.

Este trabajo fue portada del número de **Mayo de 2012** de la revista **PLoS Biology**, junto con un **comentario especial**: Weaver J (2012) Single-Molecule Technique Links Structural Fluctuations of Proteins to Brain Diseases. PLoS Biol 10(5): e1001338.doi:10.1371/journal.pbio.1001338

OPEN ACCESS Freely available online

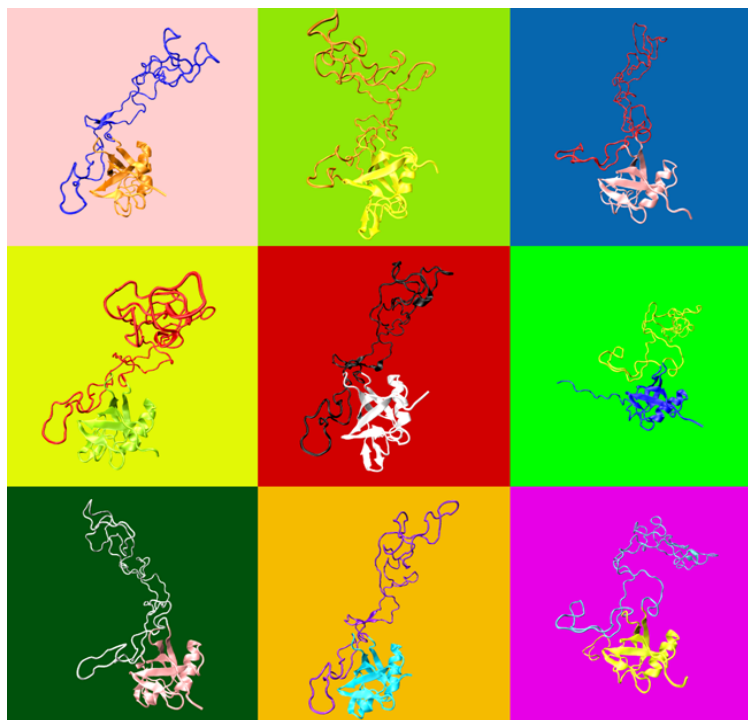
PLOS BIOLOGY

Synopsis

Single-Molecule Technique Links Structural Fluctuations of Proteins to Brain Diseases

Janelle Weaver*

Freelance Science Writer, Glenwood Springs, Colorado, United States of America



Conformational polymorphism of a neurotoxic protein. Representación artística por Àngel Gómez-Sicilia y Abert Galera-Prat. doi:10.1371/journal.pbio.1001338.g001.

*6. Oroz J, **Hervás R**, Valbuena and Carrión-Vázquez M (2012) Unequivocal single-molecule force spectroscopy of intrinsically disordered proteins. En: Uversky,V. y Dunker AK (eds.) Intrinsically Disordered Proteins Analysis: Volume II. Methods in Molecular Biology. Vol 896, doi: 10.1007/978-1-4614-3704-8_5. Springer Science Bussiness Media New York.

Mediante métodos computacionales se ha predicho que las proteínas intrínsecamente desordenadas representan alrededor de un tercio total del proteoma eucariota. El conjunto dinámico de conformaciones mostrado por esta clase de proteínas se ha presentado difícilmente accesible para técnicas biofísicas poblacionales. Sin embargo, las técnicas de manipulación de moléculas individuales han emergido como una herramienta útil para su estudio. Dentro de ellas, la espectroscopía de fuerzas basada en el microscopio de fuerzas atómicas presenta peculiaridades que la convierten en una importante metodología para analizar las propiedades biofísicas de las proteínas nativamente desestructuradas. Sin embargo, varios inconvenientes inherentes a esta técnica pueden complicar dicho análisis. Para solventar estos problemas, hemos desarrollado una estrategia basada en ingeniería de proteínas que nos permite su análisis inequívoco. A continuación, se describe un protocolo paso a paso sencillo para realizar el análisis de nanomecánico de proteínas intrínsecamente desordenadas mediante esta nueva estrategia, un procedimiento que, en principio, también puede ser usado para el estudio de cualquier proteína de interés.

Unequivocal Single-Molecule Force Spectroscopy of Intrinsically Disordered Proteins

**Javier Oroz, Rubén Hervás, Alejandro Valbuena
and Mariano Carrión-Vázquez**

Vladimir N. Uversky and A. Keith Dunker (eds.), *Intrinsically Disordered Protein Analysis: Volume 2, Methods and Experimental Tools*, Methods in Molecular Biology, vol. 896, DOI 10.1007/978-1-4614-3704-8_5, © Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract

Intrinsically disordered proteins (IDPs) are predicted to represent about one third of the eukaryotic proteome. The dynamic ensemble of conformations of this steadily growing class of proteins has remained hardly accessible for bulk biophysical techniques. However, single-molecule techniques provide a useful means of studying these proteins. Atomic force microscopy (AFM)-based single-molecule force spectroscopy (SMFS) is one of such techniques, which has certain peculiarities that make it an important methodology to analyze the biophysical properties of IDPs. However, several drawbacks inherent to this technique can complicate such analysis. We have developed a protein engineering strategy to overcome these drawbacks such that an unambiguous mechanical analysis of proteins, including IDPs, can be readily performed. Using this approach, we have recently characterized the rich conformational polymorphism of several IDPs. Here, we describe a simple protocol to perform the nanomechanical analysis of IDPs using this new strategy, a procedure that in principle can also be followed for the nanomechanical analysis of any protein.

Key words: Single-molecule force spectroscopy, Atomic force spectroscopy, Intrinsically disordered proteins, Conformational plasticity, Protein nanomechanics

7. Hervás R, Galera-Prat A, Gómez-Sicilia A, Losada-Urzáiz F, Fernandez MC, Fernández-Bravo D, Santana E, Barrio-García C, Melero C and Carrión-Vázquez M (2012) The nanomechanics of ordered and disordered proteins. En: Oberhauser A (eds) AFM studies on the mechanical properties of proteins. Springer-Verlag, Heidelberg. 1-47.

Revisión general de nanomecánica de proteínas y aplicaciones de SMFS para el estudio de proteínas que presentan tanto un plegamiento definido como para IDPs (funcionales o patogénicas).

Chapter 1

Nanomechanics of Proteins, Both Folded and Disordered

Rubén Hervás, Albert Galera-Prat, Àngel Gómez-Sicilia, Fernando Losada-Urzáiz, María del Carmen Fernández, Débora Fernández-Bravo, Elena Santana, Clara Barrio-García, Carolina Melero, and Mariano Carrión-Vázquez

A.F. Oberhauser (ed.), *Single-molecule Studies of Proteins*,
Biophysics for the Life Sciences 2, DOI 10.1007/978-1-4614-4921-8_1,
© Springer Science+Business Media New York 2013

1.1 Summary and Overview

Single-molecule techniques have recently provided a versatile tool for imaging and manipulating protein molecules one at a time, enabling us to address important biological questions in key areas of cell biology (e.g., cell adhesion and signaling, neurodegeneration) and protein science (e.g., protein folding, protein structure and stability, catalysis, protein evolution, conformational polymorphism, and amyloidogenesis). One of these techniques, single-molecule force spectroscopy (SMFS) based on atomic force microscopy (AFM), combined with theoretical/computational approaches and protein engineering, has allowed unprecedented progress in characterizing and understanding at the molecular level the mechanical properties of biomolecules, particularly those of proteins, which has recently opened the new, exciting and fast-growing research field of protein nanomechanics. The aim of this review is to describe the principles of this methodology and to discuss the main achievements in this field, with special emphasis on its emerging application to the analysis of IDPs.

8. Patente nacional e Internacional: Inventores (en orden de firma): Carrión-Vázquez M, **Hervás R**, Oroz J. Vectores de expresión en análisis nanomecánico de proteínas y su aplicación en terapia y diagnóstico. CSIC-CIBERNED, 2010. P201031846, PCT/ES2011/070867.

9. Hervás R, Fernández-Ramírez MC, Abelleiro-Hervás L and Carrión-Vázquez M (in press) Nanomechanics of neurotoxic proteins: insights at the start of the neurodegeneration cascade. In: Uversky, V.N. & Lyubchenko, A.K. (Eds.). Bionanoimaging: Insights into Protein Misfolding and Aggregation. Elsevier, Oxford. *Revisión específica sobre el uso de SMFS para el estudio de NPs y su posible uso como herramienta para comprobar la acción de potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades amiloideas.*

10. Hervás R, Galera-Prat A, Fernández-Ramírez MC, Santana E, Li L, Laurents DV, Bruix M, Menéndez M, Nagai Y, Si K, Casas S, Ferrús A and Carrión-Vázquez M (in preparation) Memory consolidation blockade by a small peptide. *En este artículo se describe el polimorfismo conformacional de la proteína priónica funcional CPEB/Orb2 (relacionado con la consolidación de memoria a largo plazo), y su inhibición mediante QBP1 in vitro e in vivo, usando modelos transgénicos de Drosophila melanogaster. Se propone la posibilidad de usar el QBP1 como agente terapéutico para evitar consolidación de recuerdos traumáticos como en el caso del síndrome de estrés post-traumático.*

11. Oroz J, Galera-Prat A, **Hervás R**, Valbuena A, Fernández-Bravo D, Gómez-Sicilia A, Müller U and Carrión-Vázquez M (in preparation) Nanomechanics of auditory cadherins: implications for physiology and deafness. *Trabajo en el que se estudia, mediante SMFS y simulaciones de dinámica molecular, la nanomecánica de cadherinas implicadas en el proceso de audición. Se analizan mutaciones directamente relacionadas con sorderas hereditarias no sindrómicas y se establece una relación entre nanomecánica y enfermedad.*

12. Isanta S, Oroz J, **Hervás R**, López-Montero I, Moleiro LH, Carrión-Vázquez M and Monroy F (in preparation) Artificial adhesion of membrane mediated by C-Cadherin. *Trabajo en el que se estudia la biofísica de fusión de membranas a partir de un modelo sintético de vesículas lipídicas que expresan en su superficie el ectodominio de C-cadherina. Se hace un análisis exhaustivo de la energética de fusión de membranas mediada por esta proteína.*

13. Fernández-Ramírez MC, **Hervás R**, Cuadros R, Laurents DV, Ávila J and Carrión-Vázquez M (in preparation) Nanomechanics of tau protein and its interaction with tubulin studied by single-molecule force spectroscopy. *Trabajo en desarrollo en el que estamos midiendo, mediante SMFS, las fluctuaciones conformacionales de tau. Adicionalmente, hemos diseñado un experimento para estudiar la nanomecánica de su interacción con tubulina, su ligando natural, y ver posibles efectos a nivel de mutaciones que nos puedan indicar mecanismos moleculares que ayuden a entender su citotoxicidad.*

14. Hervás R, Galera-Prat A, Gómez-Vera A and Carrión-Vázquez M (in preparation). Nanomechanics of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: physiological implications. *Trabajo actualmente en desarrollo en el que se estudia la nanomecánica de una proteína de adhesión implicada en esclerosis múltiple. En esta enfermedad la vaina de mielina que recubre los axones de los oligodendrocitos se encuentra alterada. Estamos comprobando la hipótesis postulada para esta proteína que le asigna un posible papel de "pegamento molecular", que actuando como un heterodímero que ayudaría a mantener la integridad estructural de la vaina de mielina.*